

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ : A23L 1/09, C08L 3/00, A61K 9/20, 31/715, A23K 1/16	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/38537 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 6. Juli 2000 (06.07.00)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/09298 (22) Internationales Anmeldedatum: 30. November 1999 (30.11.99) (30) Prioritätsdaten: 198 60 375.4 28. Dezember 1998 (28.12.98) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): AVENTIS RESEARCH & TECHNOLOGIES GMBH & CO. KG [DE/DE]; D-65926 Frankfurt am Main (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BENGS, Holger [DE/DE]; Bindingstrasse 3, D-60598 Frankfurt (DE). BRUNNER, Anette [DE/DE]; Wallersbacher-Weg 10, D-91154 Roth (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, CN, CZ, HR, HU, JP, NO, PL, US, ZA, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i>
(54) Title: α -AMYLASE-RESISTANT STARCH FOR PRODUCING FOODSTUFF AND MEDICAMENTS (54) Bezeichnung: α -AMYLASE-RESISTENTE STÄRKE ZUR HERSTELLUNG VON NAHRUNGS- UND ARZNEIMITTELN (57) Abstract <p>The invention relates to foodstuff and animal feed which contain resistant starch on the basis of water-insoluble linear α-1,4-D-glucans. The invention also relates to the utilisation of resistant starch on the basis of water-insoluble linear α-1,4-D-glucans as medicaments.</p> (57) Zusammenfassung <p>Die Erfindung beschreibt Lebens- und Futtermittel, die resistente Stärke auf Basis wasserunlöslicher linearer α-1,4-D-Glucane enthalten, sowie die Verwendung resistenter Stärke auf Basis wasserunlöslicher linearer α-1,4-D-Glucane als Arzneimittel.</p>		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland		Republik Mazedonien	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko		Amerika
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CM	Kamerun		Korea	PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

α -Amylase-resistente Stärke zur Herstellung von Nahrungs- und Arzneimitteln

Beschreibung

5 Die Erfindung betrifft Zusammensetzungen, die α -1,4-D-Glucane und/oder eine resistente Stärke daraus enthalten, zur Herstellung von Nahrungsmitteln. Die Erfindung betrifft ferner die Verwendung resistenter Stärke als Arzneimittel.

10 Ernährungsstudien haben gezeigt, daß falsche und einseitige Ernährung Grund zahlreicher Erkrankungen, beispielsweise von Darmerkrankungen und insbesondere von Kolonkarzinomen sind. Epidemiologische Untersuchungen zeigen, daß bei einer fettreichen und ballaststoffarmen Ernährung ein erhöhtes Risiko für die Entstehung entzündlicher Darmerkrankungen und Kolonkrebs beim Menschen besteht. Ballaststoffreicher Nahrung schreibt man dagegen einen
15 protektiven Effekt gegen kolorektale Erkrankungen zu.

Die Herstellung von sog. "Functional Food", d.h. Lebensmitteln, die nicht nur der Ernährung dienen sondern auch die Gesundheit fördern sollen, hat daher in
20 letzter Zeit zunehmend an Bedeutung gewonnen. Solche Lebensmittel sind mit Zusätzen mit gesundheitsfördernder Wirkung angereichert.

Einer der Zusätze, der für die Lebensmittelindustrie zunehmend Bedeutung erlangt hat, ist resistente Stärke (RS), d.h. Stärke, die durch α -Amylasen nicht
25 abgebaut wird. Resistente Stärke wird demnach im Dünndarm des gesunden Menschen nicht verdaut und gelangt somit in den Dickdarm. Resistente Stärken in Lebensmitteln stellen somit eine energiereduzierte, körpergebende Komponente im Sinne eines Ballaststoffs dar.

30 Mit der Aufnahme RS-haltiger Lebensmittel sind jedoch auch noch zwei weitere Funktionen verknüpft, nämlich die Substratbereitstellung für den Energiestoffwechsel der intestinalen Mikroflora und den der

Dickdarmepithelzellen. Resistente Stärke wird durch die intestinalen Mikroorganismen oxidativ zu kurzkettigen Fettsäuren wie Acetat, Propionat und Butyrat abgebaut. Diese kurzkettigen Fettsäuren wiederum dienen den Dickdarmepithelzellen, die insbesondere auf die luminale Zufuhr von Butyrat angewiesen sind, zur Aufrechterhaltung ihrer Struktur und Funktion.

Hohe luminale Butyratspiegel im Kolon können außerdem einen Schutzfaktor gegen kolorektale Erkrankungen darstellen. Während Butyrat nämlich in normalen Kolonozyten das Wachstum über eine Kette von Reaktionen steuert, die in normalen Kolonepithelzellen die Proliferation erhöht, scheint es die neoplastische Entwicklung von Kolonozyten zu unterdrücken.

Resistente Stärken kommen in der Natur nur in geringer Menge vor und entstehen während der Rekristallisation (Retrogradation) verkleisterter Stärke. Dabei bilden sich mikrokristalline Filamente, die ein Netzwerk ausbilden, wodurch eine enzymatische Hydrolyse verhindert wird.

Resistente Stärken, Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre Verwendung in Lebensmitteln sind seit langem bekannt.

So beschreibt die US-A-3 729 380 die gezielte enzymatische Behandlung von Stärke, um den Gehalt an hochverzweigtem Amylopektin zu reduzieren und den Anteil an kurzkettigen Amylosestrukturen, die gewöhnlich eine stärkere Tendenz zur Retrogradation und damit zur Bildung resistenter Stärke als native Stärken besitzen, zu erhöhen.

Die EP-A-0 564 893 beschreibt ein Verfahren zur Herstellung von RS-Produkten, bei dem eine wässrige Suspension einer Stärke verkleistert und mit einem Enzym, das die α -1,6-glykosidischen Bindungen spaltet, entzweigt wird. Das entstandene Zwischenprodukt wird anschließend retrogradiert.

Die EP-A-0 688 872 beschreibt ein Verfahren zur Herstellung von RS-Produkten, bei dem eine wässrige Suspension einer partiell abgebauten, verkleisterten Stärke enzymatisch entzweigt und das Zwischenprodukt retrogradiert wird.

5 In der US-A-5 776 887 wird eine Lebensmittelzusammensetzung für Diabetiker mit unterschiedlichen Kohlenhydratfraktionen offenbart, die unterschiedlich schnell absorbiert werden. Die langsam absorbierte Fraktion besteht dabei aus einer Maisstärke, die auch einen Gehalt an resistenter Stärke aufweist. Die US-A-5 776
10 887 stellt sich die Aufgabe, Kohlenhydrate über einen längeren Zeitraum gleichmäßig freizusetzen, um überhöhte Glucosespiegel zu vermeiden.

Es besteht jedoch weiterhin ein starker Bedarf an verbesserten Nahrungsmitteln und Präparaten, die durch Zufuhr gesundheitsfördernder Stoffe das Wohlempfinden des Konsumenten steigern, einer fehlerhaften Ernährung
15 vorbeugen können und Krankheiten, beispielsweise ernährungsbedingter Natur, heilen helfen.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es daher, Lebens- und Futtermittel (im
20 folgenden kollektiv Nahrungsmittel genannt) einerseits sowie pharmazeutische und veterinärmedizinische Mittel (im folgenden kollektiv Arzneimittel genannt) andererseits bereitzustellen, die den Erhalt der Gesundheit fördern, das Wohlbefinden stärken und zur Behandlung und/oder Vorbeugung von Erkrankungen, beispielsweise infolge von Mangelernährung, bei Mensch oder Tier eingesetzt werden können.

25 Diese Aufgabe wurde durch den Einsatz von wasserunlöslichen linearen α -1,4-D-Glucanen in Kombination mit Lebens- oder Futtermitteladditiven zur Herstellung der oben genannten Produkte gelöst. In diesem Sinne versteht sich die vorliegende Erfindung als Weiterentwicklung der älteren, nicht vorveröffentlichten
30 DE-A-198 30 618, die die Verwendung wasserunlöslicher α -1-4-D-Glucane zur Herstellung resistenter Stärke beschreibt.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind demnach Zusammensetzungen, insbesondere zur Nahrungsergänzung, die ein wasserunlösliches lineares α -1,4-D-Glucan und/oder eine daraus erhältliche resistente Stärke und wenigstens ein weiteres Lebens- oder Futtermitteladditiv enthalten.

5 Gegenstand der Erfindung sind ferner Nahrungsmittel, die mit diesen Zusammensetzungen erhältlich sind.

10 Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ferner die Verwendung resistenter Stärke auf Basis wasserunlöslicher linearer α -1,4-D-Glucane als Ersatzstoff und/oder Kalorienreduktionsmittel in Nahrungsmitteln.

15 Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind schließlich die Verwendung resistente Stärken auf Basis wasserunlöslicher linearer α -1,4-D-Glucane als Arzneimittel und pharmazeutische oder veterinärmedizinische Zusammensetzungen, die solche resistenten Stärken enthalten.

20 Es wurde überraschend gefunden, daß wasserunlösliche lineare α -1,4-D-Glucane bei der Retrogradation in großer Menge hochresistente Stärke, insbesondere vom Typ RS-III, liefern (Englyst et al. (Classification and measurement of nutritionally important starch Fractions, European Journal of Clinical Nutrition, 46 (Suppl. 23) (1992) 33-50).

25 Dies macht diese resistenten Stärken als Ersatzstoff für Nahrungsmittelinhaltsstoffe, insbesondere als Ballaststoffersatz und als Fettstoffersatz, und damit auch als Kalorienreduktionsmittel geeignet.

30 Es wurde ferner gefunden, daß die aus wasserunlöslichen linearen α -1,4-D-Glucanen erhältliche resistente Stärke beim Abbau im Dickdarm nicht nur zu einer großen Menge kurzkettiger Fettsäuren, sondern insbesondere auch zu einem hohen Anteil der besonders vorteilhaften Butyrate führt.

Es wurde ferner gefunden, daß die aus wasserunlöslichen linearen α -1,4-D-Glucanen erhaltene resistente Stärke in Kombination mit anderen Lebens- oder Futtermitteladditiven einen synergistischen oder symbiotischen Effekt zeigt, indem sich die Wirkungen der Komponenten gegenseitig verstärken.

Unter wasserunlöslichen linearen α -1,4-D-Glucanen werden im folgenden die nicht α -Amylase-resistenten Formen dieser Glucane verstanden.

Unter wasserunlöslichen α -1,4-D-Glucanen werden hierbei α -1,4-D-Glucane verstanden, die nach der Definition des Deutschen Arzneimittelbuches (DAB, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, Gori-Verlag GmbH, Frankfurt, 9. Auflage, 1987) entsprechend den Klassen 4-7 unter die Kategorien "wenig löslich", "schwer löslich", "sehr schwer löslich" und "praktisch unlöslich" fallen.

Die Wasserunlöslichkeit der erfindungsgemäß eingesetzten α -1,4-D-Glucane ist zweckmäßig derart, daß wenigstens 98%, insbesondere wenigstens 99,5%, der eingesetzten Polysaccharide unter Normalbedingungen ($T = 25^{\circ}\text{C} \pm 20\%$; $p = 101325 \text{ Pascal} \pm 20\%$) in Wasser unlöslich sind (entsprechend mindestens den Klassen 4 und 5 nach DAB).

Vorteilhaft entspricht die Wasserunlöslichkeit der eingesetzten α -1,4-D-Glucane den Klassen 6 oder 7 nach DAB.

Unter linearen α -1,4-D-Glucanen werden α -1,4-D-Glucane verstanden, deren Verzweigungsgrad maximal 4% beträgt, d.h. deren Hauptkette maximal vier Seitenketten auf 100 Monosaccharideinheiten aufweist.

Zweckmäßig beträgt der Verzweigungsgrad der wasserunlöslichen linearen α -1,4-D-Glucane in 6-Position nicht mehr als 0,5 %. In 2- oder 3-Position beträgt der Verzweigungsgrad nicht mehr als 1 % und insbesondere nicht mehr als 0,5 %.

Besonders bevorzugt sind wasserunlösliche lineare α -1,4-D-Glucane, die keine Verzweigungen aufweisen bzw. deren Verzweigungsgrad so minimal ist, daß er mit herkömmlichen Methoden nicht mehr nachweisbar ist.

5 Die gewichtsgemittelten Molekulargewichte M_w (bestimmt mittels Gelpermeationschromatographie im Vergleich zu einer Eichung mit Pullulanstandard) der erfindungsgemäß verwendeten wasserunlöslichen linearen α -1,4-D-Glucane können in einem weiten Bereich variieren. Zweckmäßig besitzen die als Ausgangsmaterial eingesetzten wasserunlöslichen linearen α -1,4-D-Glucane ein
10 Molekulargewicht M_w von $0,75 \times 10^2$ bis 10^7 g/mol, bevorzugt von 10^3 bis 10^6 g/mol und besonders bevorzugt von 10^3 bis 10^5 g/mol. Ein ganz besonders vorteilhafter Bereich liegt zwischen 2×10^3 g/mol und 8×10^3 g/mol.

15 Besonders bevorzugt weisen die verwendeten wasserunlöslichen linearen α -1,4-D-Glucane einen hohen Anteil an Polymeren mit einem Polymerisationsgrad zwischen 10 und 35 auf. Vorteilhaft weisen wenigstens 25%, bevorzugt wenigstens 30% und besonders bevorzugt wenigstens 35% der eingesetzten α -1,4-D-Glucanmoleküle einen Polymerisationsgrad von 10 bis 35 auf.

20 Die Polydispersität M_w/M_n der verwendeten wasserunlöslichen linearen α -1,4-D-Glucane kann innerhalb weiter Bereiche variieren. Bevorzugte Werte für die Polydispersität liegen im Bereich von 1,01 bis 50, insbesondere von 1,5 bis 15. Die Verwendung von Glucanen mit niedrigerer Polydispersität ist aber wegen der besseren Reproduzierbarkeit der erhaltenen Produkte bevorzugt.

25 Die verwendeten α -1,4-D-Glucane können auch chemisch in an sich bekannter Weise modifiziert sein, solange die Modifikationen im Hinblick auf die herzustellenden Nahrungs- und Arzneimittel unbedenklich sind. So können die α -1,4-D-Glucane durch Veretherung oder Veresterung in 2-, 3- oder 6-Position in
30 dem Fachmann bekannter Weise chemisch modifiziert sein. (s.a. Functional Properties of Food Components, 2nd edition, Y. Pomeranz, Academic Press (1991); Lehrbuch der Lebensmittelchemie, Belitz & Grosch, Springer Verlag

(1992); Citrat Starch Possible Application as Resistent Starch in Different Food Systems, B. Wepner et al., European Air Concerted Action, Abstract: air3ct94-2203, Functional Properties of Non-digestible Carbohydrates, Pro Fibre-Tagung, Lissabon, Februar 1998, Seite 59). Bevorzugt werden jedoch chemisch
5 unmodifizierte α -1,4-D-Glucane verwendet.

Die erfindungsgemäß verwendeten wasserunlöslichen linearen α -1,4-D-Glucane können beliebigen Ursprungs sein.

10 Beispielsweise können die wasserunlöslichen linearen α -1,4-D-Glucane aus natürlichen pflanzlichen und tierischen Quellen oder aus Mikroorganismen, die solche Glucane produzieren, durch konventionelle Isolierung und Aufreinigung erhalten werden.

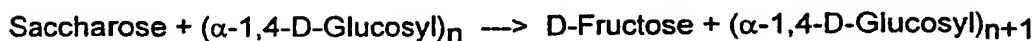
15 Da die meisten natürlichen Quellen die gewünschten wasserunlöslichen linearen α -1,4-D-Glucane aber nicht in den gewünschten Mengen enthalten, werden diese Polysaccharide vorteilhaft auf biotechnischem Wege gewonnen. Beispielsweise können die natürlichen Produzenten der wasserunlöslichen linearen Glucane gentechnisch derart manipuliert werden, daß sie im Vergleich mit dem
20 unmanipulierten Organismus einen höheren Anteil an nicht oder nur geringfügig verzweigten Polysacchariden enthalten.

Die gewünschten wasserunlöslichen linearen α -1,4-D-Glucane können auch aus hochverzweigten Glucanen durch chemische oder enzymatische Entzweigung,
25 beispielsweise mit Entzweigungsenzymen wie Pullulanasen erhalten werden.

Bevorzugt werden die erfindungsgemäß eingesetzten α -1,4-D-Glucane durch Biotransformation oder biokatalytisch hergestellt.

30 Unter Biotransformation oder biokatalytischer Herstellung wird hier verstanden, daß das wasserunlösliche α -1,4-D-Glucan in vitro durch katalytische Polymerisation von Glucosemolekülen unter Einwirkung eines geeigneten Enzyms, insbesondere eines Enzyms mit Amylosucrase-Aktivität, unter geeigneten Bedingungen hergestellt wird.

Ein vorteilhaftes biokatalytisches Verfahren zur Gewinnung wasserunlöslicher linearer α -1,4-D-Glucane wird in der WO 95/31553 beschrieben, deren Offenbarungsgehalt ausdrücklich Gegenstand der vorliegenden Beschreibung ist. Nach dem Verfahren der WO 95/31553 wird das α -1,4-D-Glucan mittels eines biokatalytischen Verfahrens aus Saccharose unter Einwirkung eines Enzyms mit Amylosucrase-Aktivität, insbesondere mit einer Amylosucrase aus Bakterien der Spezies *Neisseria polysaccharea*, hergestellt. Diese Enzyme katalysieren die Bildung von α -1,4-glykosidisch verknüpften Glucanen, indem sie unter Freisetzung von D-Fructose den Glucosylrest des Saccharosemoleküls gemäß dem folgenden Reaktionsschema



auf die wachsende Polymerkette übertragen.

Ein besonders bevorzugtes Verfahren zur Gewinnung wasserunlöslicher linearer α -1,4-D-Glucane auf Grundlage des obigen Reaktionsschemas wird in der älteren, nicht vorveröffentlichten deutschen Patentanmeldung DE-A-198 27 978.1 beschrieben, deren Offenbarungsgehalt ausdrücklich Gegenstand der vorliegenden Beschreibung ist. Hierbei werden die wasserunlöslichen linearen α -1,4-D-Glucane aus Saccharose mittels Enzymen mit Amylosucrase-Aktivität, bevorzugt aus *Neisseria polysaccharea*, in wässrigen, pufferfreien Systemen synthetisiert. Die Reaktion kann auch in Gegenwart eines wasserlöslichen linearen oder verzweigten α -1,4-D-Glucans, beispielsweise eines wasserlöslichen Dextrins oder einer wasserlöslichen Amylose durchgeführt, da solche Glucane als Glucosylgruppenakzeptoren wirken, an denen das Enzym eine α -1,4-Glucankettenverlängerung katalysiert.

Bei einer solchen Kettenverlängerung entstehen auch aus verzweigten Polysacchariden wasserunlösliche lineare Polysaccharide im Sinne der vorliegenden Erfindung, da der Verzweigungsgrad des Glucosylgruppenakzeptors mit zunehmender Kettenverlängerung, also zunehmendem Polymerisationsgrad stark abnimmt. Zu diesem Zweck wird die Saccharose in großem molaren

Überschuß zum Akzeptor eingesetzt. Auf diese Weise lassen sich α -1,4-D-Glukane mit einem Molekulargewicht im Bereich von $0,75 \times 10^2$ g/mol bis 10^7 g/mol herstellen. Die linearen oligomeren oder polymeren Akzeptoren können dabei entweder von außen zugesetzt werden, sie können jedoch auch durch die Amylosucrase selbst aus Saccharose erzeugt werden.

Die Bildung der resistenten Stärke erfolgt durch Retrogradierung der nichtresistenten wasserunlöslichen linearen α -1,4-D-Glucane.

Die Retrogradierung der α -1,4-D-Glucane kann nach an sich bekannten Verfahren erfolgen, beispielsweise durch Erhitzen oder Extrusion.

Ein besonders bevorzugtes Verfahren zur Herstellung resistenter Stärke wird in der älteren, nicht vorveröffentlichten DE-A-198 30 618 beschrieben, auf die hier ausdrücklich Bezug genommen wird und deren Offenbarung Gegenstand der vorliegenden Beschreibung bildet. Dieses Verfahren ist einfach durchzuführen und liefert α -1,4-D-Glucanpräparationen mit einem hohen Anteil resistenter Stärke.

In einer vorteilhaften Ausführungsform entsprechend der genannten DE-A-198 30 618 erfolgt die Herstellung der resistenten Stärke dadurch, daß zunächst eine wäßrige Suspension oder Dispersion der α -1,4-D-Glucane hergestellt wird. Diese Suspension oder Dispersion wird anschließend erwärmt, beispielsweise auf eine Temperatur von 50°C bis 100°C, und dann wird der erhaltene Kleister auf eine Temperatur von vorzugsweise im Bereich von 35°C bis zum Gefrierpunkt abgekühlt, bei der das α -1,4-D-Glucan retrogradiert, und dann gegebenenfalls getrocknet.

Die Begriffe "Suspension", "Dispersion" und Kleister haben hierbei die dem Fachmann geläufige Bedeutung (s.a. Römpf, Chemie-Lexikon, 9. Auflage, Thieme-Verlag).

In einer anderen Ausführungsform entsprechend der DE-A-198 30 618 erfolgt die Herstellung der resistenten Stärke dadurch, daß die wäßrige Suspension oder

Dispersion der α -1,4-D-Glucane eingefroren wird, wobei das α -1,4-D-Glucan retrogradiert wird. Nach dem Auftauen wird dann gegebenenfalls getrocknet oder entwässert.

5 Die vollständige oder teilweise Retrogradierung der wasserunlöslichen linearen α -1,4-D-Glucane und die Bildung resistenter Stärke kann erfolgen, bevor die α -1,4-D-Glucane mit den Lebens- und Futtermitteladditiven zusammengegeben werden, sie kann während des Zusammenbringens der Bestandteile der Zusammensetzung erfolgen oder sie kann in der Mischung aus wasserunlöslichen
10 linearen α -1,4-D-Glucanen, Additiven und gegebenenfalls weiteren Bestandteilen erfolgen.

Unter Lebens- und Futtermitteladditiven werden hier sowohl Stoffe als auch Mikroorganismen verstanden, die Lebens- oder Futtermitteln zur Beeinflussung
15 oder zur Erzielung bestimmter Eigenschaften oder Wirkungen zugesetzt werden. Darunter fallen insbesondere Additive, die einen positive Effekt auf die Gesundheit und das Wohlbefinden von Mensch und Tier haben.

Die Lebens und Futtermitteladditive können Probiotika, Prebiotika oder sonstige
20 Zusatzstoffe sein.

Unter Probiotika werden nicht-pathogene Mikroorganismen verstanden, die dem Lebens- oder Futtermittel lebend oder in Sporenform zugesetzt werden und die die Darmflora positiv beeinflussen können.

25 Beispiele für als Probiotika geeignete Mikroorganismen sind insbesondere Bakterien und Pilze. Bevorzugte Mikroorganismen sind Milchsäurebakterien, insbesondere der Gattung Lactobacillus, beispielsweise Bifidobakterien, Mikroorganismen der Gattung Streptococcus, beispielsweise Enterococcus-
30 Stämme, und Hefen, beispielsweise der Gattung Saccharomyces, insbesondere der Spezies Saccharomyces boulardii.

Unter Prebiotika werden nicht verdauliche Stoffe verstanden, die dem Lebens- oder Futtermittel zugesetzt werden und die das Wachstum von bestimmten Bakterien im Dickdarm fördern.

5 Beispiele für Prebiotika sind insbesondere Ballaststoffe, beispielsweise Nahrungsfasern wie Oligo- und Polysaccharide, beispielsweise Inulin, Oligofruktosen, Oligofructane und Fructo-Oligosaccharide.

10 Sonstige Zusatzstoffe sind Vitamine und Provitamine, insbesondere Vitamin A, die Vitamine B₁, B₂, B₃, B₅, B₆, B₉ und B₁₂, Vitamin C, Vitamin D, Vitamin E, Vitamin F und Vitamin K; Antioxidantien; Öle, Fette und Fettsäuren, insbesondere mehrfach ungesättigte Fettsäuren, beispielsweise Ω -3-Fettsäuren oder essentielle Fettsäuren wie Linol- und Linolensäure; sowie Kräuter und Extrakte.

15 Bevorzugt können Kombinationen von α -1,4-D-Glucanen und/oder resistenter Stärke und Lebens- und Futtermitteladditiven eingesetzt werden, die einerseits die technischen Voraussetzungen zur Verarbeitung des Lebensmittels nicht verändern und andererseits das Eigenschaftsbild des Lebensmittels nicht wesentlich beeinflussen. Dies ist zum Beispiel der Fall, wenn der kalorische
20 Haushalt des Lebensmittels durch die funktionellen Additive nicht verändert wird. Dies wird entweder erreicht, indem beide oder mehrere funktionelle Additive gegenüber speziellen Eigenschaften neutral sind oder der positive oder negative Effekt des einen funktionellen Inhaltsstoffs durch den negativen oder positiven Effekt des anderen funktionellen Inhaltsstoffs gerade aufgehoben wird.

25 Besonders vorteilhaft sind Zusammensetzungen, die neben dem wasserunlöslichen linearen α -1,4-D-Glucan und/oder der resistenten Stärke, die selbst ein Prebiotikum darstellt, Probiotika enthalten. Bevorzugt ist das Probiotikum ein Bifidobakterium. Diese Kombination führt zu einem unerwarteten
30 symbiotischen Effekt, indem die resistente Stärke von den intestinalen Mikroorganismen unter Bildung kurzkettiger Fettsäuren verdaut wird, die wiederum als Nährstoff für die Bifidobakterien dienen und deren Proliferation fördern.

Die Herstellung der erfindungsgemäßen Zusammensetzungen kann durch einfaches Mischen erfolgen.

5 In einer besonders vorteilhaften Ausführungsform dient das wasserunlösliche lineare α -1,4-D-Glucan oder die daraus erhältliche resistente Stärke als Träger für wenigstens ein Lebens- oder Futtermitteladditiv.

10 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform liegt das wasserunlösliche lineare α -1,4-D-Glucan oder die daraus erhältliche resistente Stärke in Form von Mikropartikeln, insbesondere sphärischen Mikropartikeln vor, die ganz oder teilweise aus dem Glucan bestehen. Dies ist besonders vorteilhaft, wenn das wasserunlösliche lineare α -1,4-D-Glucan oder die daraus erhältliche resistente Stärke als Träger für das Lebens- und Futtermitteladditiv dienen soll.

15 Unter sphärischen Mikropartikeln werden hierbei annähernd kugelförmige Mikropartikel verstanden, deren Abweichung in den Achsenlängen vom Idealzustand einer Kugel, die durch von einem gemeinsamen Ursprung ausgehende, in den Raum gerichtete Achsen gleicher Länge, die den Radius der Kugel in allen Raumrichtungen definieren, beschrieben wird, nicht mehr als 40% beträgt. Bevorzugt werden sphärische Mikropartikel mit Abweichungen von nicht
20 mehr als 25%, besonders bevorzugt nicht mehr als 15% verwendet.

Die spezifische Oberfläche der Mikropartikel liegt zweckmäßig in einem Bereich von 1 m²/g bis 100 m²/g, bevorzugt von 1,5 m²/g bis 20 m²/g und besonders
25 bevorzugt von 3 m²/g bis 10 m²/g.

Der mittlere Durchmesser (Zahlenmittelwert) der Mikropartikel liegt zweckmäßig in einem Bereich von 1 nm bis 100 μ m, bevorzugt von 100 nm bis 10 μ m und besonders bevorzugt von 1 μ m bis 5 μ m.

30 Die Dispersität $D = d_w/d_n$ der Mikropartikel, worin d_w den Gewichtsmittelwert des Durchmessers und d_n den Zahlenmittelwert des Durchmessers der Mikropartikel

bedeutet, liegt zweckmäßig in einem Berich von 1 bis 10, vorzugsweise von 1,5 bis 5 und bevorzugt von 2 bis 3. Die Mittelwerte d_w und d_n sind definiert als

$$d_n = \sum n_i \times d_i / \sum n_i; \text{ und}$$

$$5 \quad d_w = \sum n_i \times d_i^2 / \sum n_i \times d_i$$

worin

- 10 d_i den Durchmesser der Partikel der Spezies i bedeutet;
 n_i die Anzahl der Partikel i mit dem Durchmesser d_i ; und
 i einen fortlaufenden Parameter bedeutet.

15 Der Begriff Gewicht steht in diesem Zusammenhang nicht für Masse sondern für ein gewichtetes Mittel, wodurch die größeren Durchmesser einen höheren Stellenwert erhalten. Durch den Exponenten 2 werden Durchmesser größerer Partikel stärker gewichtet.

20 Die Bildung von Mikropartikeln, die ganz oder teilweise aus resisteter Stärke bestehen, kann beispielsweise durch einfaches Vermahlen der resistenten Stärke, die aus dem oben beschriebenen Kleister erhalten wurde, erfolgen.

25 Weitere Verfahren zur Herstellung von Mikropartikeln werden in den älteren deutschen Patentanmeldungen DE-A-197 37 481.6, DE-A-198 39 214.1, DE-A-198 39 216.9 und DE-A-198 39 212.5 beschrieben, auf die hier ausdrücklich Bezug genommen wird und deren Offenbarung ebenfalls Bestandteil der vorliegenden Beschreibung bildet.

30 Die Herstellung der bevorzugt sphärischen Mikropartikel erfolgt zweckmäßig durch Lösen der wasserunlöslichen α -1,4-D-Glucane oder der daraus erhältlichen resistenten Stärke in einem lebensmitteltechnologisch unbedenklichen Lösungsmittel, beispielsweise durch Lösen in wässrigem Alkali, Einbringen der Lösung in ein Fällmittel, vorzugsweise Wasser, Kühlen des dabei entstehenden

Gemisches auf vorzugsweise 10°C bis -10°C und Abtrennen der gebildeten Mikropartikel.

Struktur und Oberfläche der Mikropartikel können durch die Art des Fällmittels gesteuert werden. Durch die Mitverwendung geeigneter, insbesondere in der Lebensmitteltechnologie zugelassener Zusatzstoffe, beispielsweise Zuckern wie Fructose, Saccharose und Glucose, kann ebenfalls Einfluß auf Struktur, Größe und Oberfläche der Partikel genommen werden.

Die Konzentration des α -1,4-D-Glucans oder der resistenten Stärke in der Lösung kann in einem weiten Bereich variieren und beträgt vorzugsweise ungefähr 0,1 bis 1 g pro ml Lösungsmittel.

Mikropartikel mit einer mittleren Größe von 0,1 μ m bis 3 μ m lassen sich bei diesem Verfahren vorteilhaft erhalten, wenn man dem Fällmittel ein heißwasserlösliches α -D-Glucan zusetzt.

Die Porosität der Mikropartikel läßt sich auch durch die Wahl des Verfahrens zur Herstellung des wasserunlöslichen linearen α -1,4-D-Glucans steuern. So kann beispielsweise der Zusatz von Hilfsstoffen bei der biotechnologischen Herstellung der Polysaccharide die Porosität der aus solchen Polysacchariden erhaltenen Mikropartikel beeinflussen. Insbesondere wurde gefunden, daß die Porosität von Mikropartikeln, die ganz oder teilweise aus den wasserunlöslichen linearen α -1,4-D-Glucanen gebildet werden, erhöht werden kann, wenn die Herstellung des Glucans aus Saccharose mittels Amylosucrase in Gegenwart eines Glucosylgruppenakzeptors, beispielsweise Dextrin, erfolgt. Dabei werden die Mikropartikel umso poröser, je höher die Konzentration des Glucosylgruppenakzeptors bei der Biotransformation ist.

Das Aufbringen der Lebens- und Futtermitteladditive auf das Trägermaterial kann beispielsweise bei flüssigen Lebens- und Futtermitteladditiven wie ungesättigten Fettsäuren durch einfaches Mischen erfolgen. Die Additive können aber auch dem Fällbad zugegeben werden, aus dem man die Mikropartikel gewinnt. Bei der

Bildung der Mikropartikel adsorbieren die Additive dann auf der Oberfläche der Partikel.

5 In einer weiteren vorteilhaften Ausführungsform werden die Lebens- und Futtermitteladditive mit den wasserunlöslichen linearen α -1,4-D-Glucanen oder der resistenten Stärke wenigstens teilweise ummantelt oder verkapselt. Auf diese Weise wird nicht nur die synergistische oder symbiotische Wirkung verstärkt, sondern auch ein zusätzlicher stabilisierender Effekt erreicht. Besonders vorteilhaft ist diese Ausführungsform bei einer Kombination von

10 wasserunlöslichen linearen α -1,4-D-Glucanen und/oder resistenter Stärke mit Probiotika, wobei die lebenden Organismen mittels einer Schicht aus resistenter Stärke und gegebenenfalls anderen Polysacchariden verkapselt und dadurch auch vor schädlichen Einflüssen, die beispielsweise während der Verarbeitung von Nahrungsmitteln auftreten, geschützt werden.

15 Die Ummantelung kann in an sich bekannter Weise durch wäßrige Dispersions- oder Suspensionsprozesse erfolgen.

20 Die Zusammensetzungen können ausschließlich aus den wasserunlöslichen linearen α -1,4-D-Glucanen und/oder den daraus erhältlichen resistenten Stärken und den jeweiligen Additiven bestehen oder weitere Zusatzstoffe, beispielsweise weitere Nahrungsergänzungsmittel enthalten.

25 Die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen können die wasserunlöslichen linearen α -1,4-D-Glucose in nicht α -Amylase-resistenter Form, in Form der daraus erhältlichen resistenten Stärke oder in Form von Mischungen daraus enthalten.

30 In einer möglichen Ausführungsform enthält die erfindungsgemäße Zusammensetzung die Glucose überwiegend als wasserunlösliche lineare α -1,4-D-Glucose, also in nicht α -Amylase-resistenter Form. Solche Zusammensetzungen eignen sich beispielsweise zur Herstellung von Lebensmitteln und Lebensmittelvorprodukten, in denen die resistente Stärke erst

durch eine Weiterbehandlung oder eine Verarbeitung vor dem Verzehr, beispielsweise durch Erwärmen, gebildet wird.

In einer weiteren Ausführungsform enthält die erfindungsgemäße Zusammensetzung die Glucane überwiegend in Form resistenter Stärke. Solche Zusammensetzungen können den Nahrungsmitteln beispielsweise auch nach Verarbeitungsschritten wie Erwärmen oder Erhitzen zugegeben werden. In solchen Zusammensetzungen wird der Gehalt an resistenter Stärke, bezogen auf die Gesamtmenge an α -1,4-D-Glucan, möglichst hoch gewählt. Zweckmäßig beträgt der Gehalt, wie bestimmt nach Englyst (siehe supra), wenigstens 25 Gew.-%, bevorzugt wenigstens 65 Gew.-%, insbesondere 75%, und besonders bevorzugt wenigstens 90 Gew.-%, insbesondere 95 bis 99 Gew.-% und mehr.

Die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen können in einer Vielzahl von Nahrungsmitteln eingesetzt werden. Beispiele für geeignete Lebensmittel sind Milch und Milchprodukte wie Yoghurt, Quark oder Schnitten und Pudding; Brot, Aufstriche, Getränke, Müsliriegel, Cerealien, Kekse, Kuchen, Gebäck, Soßen, Nudeln, Kartoffelpüree und andere Kartoffelgerichte wie Pommes Frites, Aufläufe, Verdicker, Designer Drinks, Getränkepulvern und Fertiggerichten.

Resistente Stärke auf Basis wasserunlöslicher linearer α -1,4-D-Glucane und ihre Zusammensetzungen können als Ersatzstoff für Nahrungsmittelinhaltsstoffe verwendet werden, insbesondere als Fettstoffersatz, und damit als Kalorienreduktionsmittel dienen. Sie können auf diese Weise eine Zellstimulation bewirken und den Appetit beeinflussen.

Der Abbau der resistenten Stärke im Darm zu kurzkettigen Fettsäuren, insbesondere zu besonders vorteilhaftem Butyrat, ihre Eignung als Ersatzstoff und die synergistischen und symbiotischen Effekte in Kombination mit anderen Lebens- oder Futtermitteladditiven sind jedoch nicht der einzige Vorteil bei der Verwendung resistenter Stärke in Nahrungsmitteln. Resistente Stärke kann nämlich insbesondere zusammen mit anderen Lebens- oder Futtermitteladditiven

auch dazu benutzt werden, die Eigenschaften der Lebensmittel zu verbessern. So kann die erfindungsgemäße Zusammensetzung, abhängig von der Wahl der Additive, zu einer Erhöhung der Gelbildung, einer Verbesserung der Fließeigenschaften, einer Erhöhung oder Erniedrigung der Viskosität, einer Verbesserung des Sorptionsverhaltens, einer Erhöhung oder Verringerung der Quelleigenschaften und einer Verbesserung der Verkleisterungstemperatur von Produkten führen, die Polysaccharide enthalten. Ebenso kann die erfindungsgemäße Zusammensetzung eingesetzt werden, um die Löslichkeit, die Transparenz und die Textur der Kleisterstruktur zu beeinflussen und die Wärme-, Kälte-, Säure- und Scherstabilitäten der Produkte zu verbessern. Ferner kann der Einsatz der erfindungsgemäßen Zusammensetzungen die Filmbildungstendenz erhöhen, die Gefrier- und Taustabilitäten positiv beeinflussen und die Verdaulichkeit verbessern. Daneben können auch kaschierende Effekte zum Tragen kommen, die sich auf den geschmack, das sog. Mundgefühl (mouth feel) oder den Geruch begründen.

Die Tatsache, daß die aus wasserunlöslichen linearen α -1,4-D-Glucanen erhältlichen resistenten Stärken bei der Verdauung einen überaus hohen Gehalt an für die Darmflora günstigen Butyraten liefert, macht diese Stärke auch für die Verwendung in medizinischen und veterinärmedizinischen Präparaten geeignet, insbesondere in Kombination mit anderen funktionellen Additiven, beispielsweise den oben erwähnten Lebens- und Futtermitteladditiven, aber auch zusammen mit anderen Heilmitteln. Die Verwendung von resistenter Stärke auf Basis wasserunlöslicher linearer α -1,4-D-Glucane als Arzneimittel, allein oder in Kombination mit anderen funktionellen Additiven, wirkt sich auf zahlreiche Krankheitsbilder positiv aus. So eignen sich Arzneimittel auf Basis der erfindungsgemäßen resistenten Stärke beispielsweise zur Behandlung von Herzerkrankungen, Magen-Darm-Erkrankungen, Arthritis, immunologischen Erkrankungen, mentalen Dysfunktionen, Nervenerkrankungen, psychischen Störungen, Schlafstörungen, Erkrankungen der Muskulatur, Krankheiten, die den Hormonhaushalt beeinflussen, Schilddrüsenerkrankungen, Krankheiten der inneren Organe, Veränderungen des Blutbilds, Kreislauferkrankungen, Allergien, Hauterkrankungen und Erkrankungen, die auf Mangelernährung zurückzuführen

sind. Ebenso können Präparate mit resistenter Stärke als Appetitzügler eingesetzt werden.

Dementsprechend ist resistente Stärke auf Basis wasserunlöslicher α -1,4-D-Glucane, allein oder in Kombination mit anderen funktionellen Additiven, auch als Arzneimittel einsetzbar, und zwar sowohl als Therapeutika als auch als Prophylaktika oder Diagnostika. Die medizinischen, resistente Stärke enthaltenden Präparate können hierbei übliche Hilfs- und Trägerstoffe enthalten und in den üblichen Darreichungsformen, beispielsweise in Form von Tabletten, Depot-Formulierungen oder Mitteln mit kontrollierter Wirkstofffreisetzung vorliegen.

Die vorliegende Erfindung wird durch die nachfolgenden Beispiele näher erläutert:

Beispiele

Beispiel 1

Herstellung von α -1,4-D-Glucanen

In ein 5-l-Gefäß wurden 5 l einer sterilisierten 30%igen Saccharose Lösung gegeben. Ein Enzymextrakt, der eine Amylosucrase aus *Neisseria polysaccharea* enthielt (WO-A-95/31553), wurde in einer Portion zugegeben und es wurde gemischt. Die eingesetzte Enzymaktivität beträgt in diesem Experiment 148000 Units. Das verschlossene Gefäß wurde bei 37°C inkubiert. Während der Dauer der Biotransformation bildete sich ein weißer Niederschlag. Die Reaktion wurde nach 39 h beendet. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert, bei -70°C eingefroren und anschließend gefriergetrocknet. Die Masse des gefriergetrockneten Feststoffes betrug 526,7 g (70,2 % Ausbeute).

Zur Abtrennung niedermolekularer Zucker wurden 200 g des Feststoffes mit Wasser 30 min unter Rühren bei Raumtemperatur gewaschen, bei -70 °C eingefroren und gefriergetrocknet. Der Gehalt an Fruktose und Saccharose wurde

nach Lösen des Feststoffes in DMSO durch einen gekoppelten enzymatischen Assay bestimmt und betrug 4,61 mg Fruktose pro 100 mg Feststoff (4,6 %). Der Gehalt an Saccharose lag unter der Nachweisgrenze.

5 Der Überstand der Biotransformation wurde bei 95°C denaturiert. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde erneut zentrifugiert. Der klare Überstand wurde bei -70°C eingefroren und über 3 Tage bei 4 °C aufgetaut. Der so erzeugte Niederschlag wurde bei -70 °C eingefroren und gefriergetrocknet.

10 Zur Abtrennung niedermolekularer Zucker wurden 39,5 g des Feststoffes mit Wasser 30 min unter Rühren bei Raumtemperatur gewaschen, bei -70°C eingefroren und gefriergetrocknet. Der Gehalt an Fruktose und Saccharose wurde nach Lösen des Feststoffes in DMSO durch einen gekoppelten enzymatischen Assay gemäß STITT et al. (Meth. Enzym., 174 (1989) 518 - 552) bestimmt und
15 betrug 2,27 mg Fruktose pro 100 mg Feststoff. Der Gehalt an Saccharose lag unter der Nachweisgrenze.

Beispiel 2

20 Bestimmung des Molekulargewichts des nach Beispiel 1 erhaltenen Materials

Es wurden 2 mg des α -1,4-D-Glucans aus Beispiel 1 bei Raumtemperatur in Dimethylsulfoxid (DMSO, p.a. von Riedel-de-Haen) gelöst und filtriert. Ein Teil der Lösung wurde in eine Säule zur Gelpermeationschromatographie injiziert. Als
25 Elutionsmittel wurde DMSO verwendet. Die Signalintensität wurde mittels eines RI-Detektors gemessen und gegen Pullulanstandards (Firma Polymer Standard Systems) ausgewertet. Die Flußrate beträgt 1.0 ml pro Minute.

Die Messung ergibt ein Zahlenmittel des Molekulargewichts (M_n) von 2.326 g/mol
30 und ein Gewichtsmittel des Molekulargewichts (M_w) von 3.367 g/mol. Die Wiederfindungsrate beträgt 100 %.

Beispiel 3**Bestimmung des RS-Gehaltes**

5 200 mg (Trockengewicht) des auf seinen RS-Gehalt zu analysierenden pulverförmigen Produktes wurden nach der Methode von Englyst et al. (Eur. J. Clin. Nutrition, 46 (1992) (Suppl. 2) S 33-550) zur Bestimmung des RS-Gehaltes mit der beschriebenen Enzymmischung bei pH 5,2 120 min inkubiert. Nach
10 Beendigung des enzymatischen Abbaus wurde die Aktivität der Enzyme durch Erniedrigung des pH-Wertes auf einen Wert von 3 und der Temperatur auf 20°C gestoppt. Anschließend erfolgte durch Zugabe der 4-fachen Menge an Ethanol die Einstellung einer 80%igen (v/v) ethanolischen Lösung. Die 80%ige ethanolische Lösung wurde 1 h bei Raumtemperatur stehengelassen. Das Präzipitat wurde zentrifugiert (2500 x g, 10 min) und der
15 Überstand verworfen. Der Rückstand wurde dreimal mit 80%igem (v/v) Ethanol und einmal mit absolutem Ethanol gewaschen und zentrifugiert. Der Rückstand wurde lyophilisiert und gewogen. Die Trockenmasse des Rückstandes wurde bestimmt und der RS-Gehalt nach folgender Gleichung berechnet:

20
$$\text{RS [\%]} = 100 \times \frac{\text{Gewicht des Rückstandes (Trockengewicht)}}{\text{Einwaage (Trockengewicht)}}$$

Beispiele 4 bis 7

25 Ein lineares, naturidentisches α -1,4-D-Glukan nach Beispiel 1 wurde in wässriger Lösung erhitzt und ein Kleister gebildet. Dieser Kleister wurde auf 10 Gew.-% Feststoffanteil eingestellt und portioniert. Die Portionen wurden bei 4 und 25°C (Beispiel 5 bzw. 6) oder mit Hilfe eines Stufenprogramms (Beispiel 7) retrogradiert. Des weiteren wurde das lineare Kohlenhydratpolymer aus dem
30 Reaktionsansatz ausgefroren (Beispiel 4). Die retrogradierten Muster wurden getrocknet und die Bestimmung des RS-Gehaltes wie oben beschrieben durchgeführt.

Tabelle 1 illustriert den Einfluß der Retrogradationstemperatur und -bedingungen auf den RS-Gehalt im Produkt, hergestellt aus einem 10-proz. Kleister der verwendeten α -1,4-D-Glucane durch 24-stündige Retrogradation.

5 Tabelle 1

Beispiel	Retrogradationstemperatur	RS (Gew.-%)
4	-70°C	78 ± 4
5	4°C	70 ± 2
6	25°C	87 ± 1
7	Stufenprogramm	74 ± 3

Das Beispiel in Tabelle 1 zeigt, daß die Retrogradationstemperatur den RS-Gehalt beeinflusst. So führt eine Retrogradation bei 25 °C zu einem deutlich höheren RS-Anteil verglichen mit einer Retrogradation bei 4 °C. Durch Retrogradation bei -70 °C erhält man hingegen einen leicht höheren RS-Anteil verglichen mit dem nach Retrogradation bei 4°C.

Beispiel 8

Bestimmung der Löslichkeit der von α -1,4-D-Glucanen und Klassifizierung nach Deutschem Arzneimittelbuch (DAB)

564 mg α -1,4-D-Glucan aus Beispiel 1 wurden in ca. 0,5 l bidestilliertem Wasser bei 1,3 bar und 130 °C für 1,5 Stunden in einem Autoklaven erhitzt (Apparat Certoclav). Von dem Reaktionsgefäß ist zuvor das Gewicht gemessen worden. Danach wird die Apparatur entspannt und bei Raumtemperatur abgekühlt. Der Inhalt wird gewogen. Er entspricht 501,74 g. Nach weiteren 24 Stunden wird zentrifugiert und dekantiert. Der feste Rückstand wird getrocknet und ausgewogen. Es sind 468 mg. Daraus errechnet sich ein gelöster Anteil von 96 mg. Bezogen auf das eingesetzte Lösungsmittel errechnet sich daraus, daß für 1 mg α -1,4-D-Glucan 5226 mg Wasser notwendig sind. Gemäß der Klassifizierung nach Deutschem Arzneimittelbuch ergibt sich daraus die Einteilung, daß diese Substanz "sehr schwer löslich" ist, da zwischen 1.000 und 10.000 Teilen

Lösungsmittel notwendig sind, um 1 Teil der Substanz in Lösung zu bringen. Dies entspricht der Löslichkeitsklasse 6 nach DAB.

Beispiel 9

5 Bestimmung der Löslichkeit von α -1,4-D-Glucanen und Klassifizierung nach
Deutschem Arzneimittelbuch (DAB)

10 Der Versuch wurde mit einem auf ähnliche Weise wie in Beispiel 1 erhaltenen α -
1,4-D-Glucan entsprechend Beispiel 8 durchgeführt. Den einzigen Unterschied
bildete ein Kühlprozeß, der nach der Autoklavbehandlung und dem Abkühlen auf
Raumtemperatur nachgeschaltet wurde. Das Substanzgemisch wird für 3 Stunden
bei 5 °C aufbewahrt.

15 Es wurden 526 mg α -1,4-D-Glucan auf ca. 480 ml bidestilliertem Wasser
eingewogen. Nach der thermischen Behandlung ergab sich eine Auswaage von
468,09 g. Das getrocknete Sediment betrug 488 mg. Demnach waren 38 mg des
 α -1,4-D-Glucan in Lösung gegangen. Dies entsprach einem Verhältnis von 1 mg
Substanz zu 12.305 Teilen Lösungsmittel. Demnach war die Substanz nach
20 dieser Behandlungsmethode in Klasse Nummer 7 nach DAB einzustufen und
danach als praktisch unlöslich zu klassifizieren, weil mehr als 10.000 Teile
Lösungsmittel für ein Teil Substanz benötigt wurden.

Beispiel 10

25 Herstellung von Müsliriegeln mit resistenter Stärke

Es wurden Müsliriegel mit wechselnden Mengen resistenter Stärke (RS)
hergestellt.

30 Grundrezept: 40% Honig
 30% Haferflocken
 6% Sonnenblumenkerne
 9% Haselnüsse
 6% Haferfleks
35 9% Schokoladeblättchen

- 5 a) 40% Honig
30% Haferflocken
6% Sonnenblumenkerne
9% Haselnüsse
6% Haferfleks
9% Schokoladeblättchen
3% Amylose (RS)
- 10 b) 40% Honig
24% Haferflocken
6% Sonnenblumenkerne
9% Haselnüsse
6% Haferfleks
15 6% Schokoladeblättchen
9% Amylose (RS)
- 20 c) 36% Honig
24% Haferflocken
6% Sonnenblumenkerne
9% Haselnüsse
6% Haferfleks
6% Schokoladeblättchen
25 9% Amylose (RS)
4% Hochungesättigte Fettsäuren
- 30 d) 40% Honig
21% Haferflocken
6% Sonnenblumenkerne
9% Haselnüsse
6% Haferfleks
6% Schokoladeblättchen
35 12% Amylose (RS)

40 Die Zutaten wurden gut gemischt und ca. 4 Std. bei 70°C im Trockenschrank oder
Ofen gebacken. Die Müsliriegel waren auch bei einem Gehalt an resistenter
Stärke in ihrer Konsistenz von den Riegeln nach dem Grundrezept nicht zu
unterscheiden und wohlschmeckend.

Beispiel 11

Untersuchung der Bildung kurzkettiger Fettsäuren (SCFA) durch in vitro-Fermentation der α -Amylase resistenten Anteile durch frisch entnommene Faecesproben.

1 ml einer 5%igen Faecessuspension (15g frisch entnommenen Humanfaeces in 50 ml Soerensen-Puffer, pH 6,5; Puffer aus Kaliumhydrogenphosphat und Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat) wurden in mit Stickstoff begasten Cryo-Röhrchen mit je 10 mg, durch enzymatische Hydrolyse isolierten, resistenten Strukturen entsprechend Beispiel 1 und, als Vergleich, von Novelose, retrogradierter Maisstärke, National Starch & Chemical, USA, gemischt und homogenisiert. Die Fermentation erfolgte bei 37°C. Es wurden stündlich Proben entnommen und eingefroren.

Die Konzentration an kurzkettigen Fettsäuren wurde in einer Faecessuspension mit Hilfe der Gaschromatographie auf einer Kapillarsäule (Carbowax 20M) unter Nutzung eines Temperaturprogramms bestimmt. Als GC-System wurde eine HP 5890 Series II-Station mit HP 7673 GC/SCF-Injektor, HP GC-Autosamplercontroller, Detektor FID; Software - HP Chemstation, verwendet. Helium wurde als mobile Phase benutzt.

200 mg der Faecessuspension wurden mit der vierfachen Menge Wasser suspendiert und homogenisiert. Von dieser verdünnten Arbeitsfaecessuspension wurde ein Teil für die Trockenmassebestimmung verwendet.

500 mg der Arbeitsfaecessuspension wurden zentrifugiert. 100 μ l des Überstandes wurden mit 25 μ l 1M Natriumhydroxidlösung versetzt. Das verschlossenen Gefäß wurde mit durchbohrtem Deckel in flüssigen Stickstoff gegeben und gefriergetrocknet. Die getrocknete Probe wurde mit 100 μ l 5M Ameisensäure und 400 μ l Aceton versetzt und auf einem Vortex geschüttelt. Die sich bildende organische Phase wurde in Vials eines Autosamplers dekantiert, die sofort verschlossen wurden. Aus ihnen wurde je 1 μ l in eine GC injiziert. Als

externe Standards wurden Essigsäure, Propionsäure, Buttersäure, iso-Buttersäure, Valeriansäure und iso-Valeriansäure (Sulpeco) verwendet.

Die Fermentation der resistenten Strukturen wurden parallel in Doppelfermentationsstudien durchgeführt.

Die Fermentierbarkeit der eingesetzten Strukturen erwies sich als unterschiedlich. Insbesondere unterschieden sich die Bildungsraten und die Spektren der kurzkettigen Fettsäuren.

Durch in vitro-Fermentation der resistenten Strukturen entsprechend Beispiel 1 wurden deutlich höhere Spiegel an kurzkettigen Fettsäuren und an Butyrat in vergleichbaren Fermentationszeiten erreicht. Während durch 8stündige Fermentation der resistenten Strukturen entsprechend Beispiel 1 ein SCFA-Spiegel von ca. 2000 $\mu\text{mol/g}$ Trockengewicht eingestellt wurde, wobei der Butyratgehalt ca. 60% betrug, lag der SCFA-Spiegel nach gleicher Fermentationszeit resistenter Strukturen aus Novelose nur bei ca 750 μmol Trockengewicht. Das Butyrat war dabei mit einem Anteil von ca 35% vertreten. Durch die Fermentation resistenter Strukturen des erfindungsgemäß als Ausgangsprodukt eingesetzten wasserlöslichen α -1,4-D-Glucans wird also schneller und mehr Butyrat erzeugt als durch resistente Stärke von Novelose.

Beispiel 12

Einfluß einer Kombination von resistenter Stärke und Bifido Bakterien auf die Aktivität und das Wachstum von Bifidobakterien sowie Darmzellen

Zur Austestung des Einflusses der Kombination von resistenter Stärke und Bifido Bakterien auf die Darmflora wurden 10 g resistente Stärke, hergestellt wie in den Beispielen 4 bis 7 beschrieben, an 5 gesunde Probanden zur oralen Aufnahme über einen Zeitraum von 14 Tagen verabreicht. Die Proben wurden während des Frühstücks in Form eines Bifidobakterien enthaltenden Joghurts verzehrt, in den das Polyglucan eingerührt wurde (Joghurt LC₁ der Firma Nestlé). Die Probanden hatten

ein Durchschnittsalter von 38,9 und ein durchschnittliches Gewicht von 67,3 kg. Die Untersuchungswerte wurden mit einer Kontrolle verglichen. Die Kontrollgruppe bestand aus den gleichen Probanden. Sie wurden 3 Monate vor der zweiten Untersuchung untersucht. Es wurde Joghurt mit Bifido Bakterien ohne RS aufgenommen. Bereits 10 Wochen vor dem Beginn der Kontrolluntersuchung und in den etwa 10 Wochen von der Beendigung der ersten Kontrolluntersuchung bis zur zweiten Untersuchung (RS-Bifido) haben die Probanden keinen Joghurt oder ähnliche Lebensmittel zu sich genommen, die Bifido Bakterien enthalten. Die absolute Menge an Bifido Bakterien wurde gemäß einer erstmals in der folgenden Literatur publizierten Methode bestimmt ("A Color Atlas of Anaerobic Bacteria", 1984, Seiten 53 - 65, T. Mitsuoka (Hrsg.), Verlag Kabushiki Kaisha Sobunsha, Tokyo, Japan (1984)). Die gewachsenen Kolonien wurden in unterschiedlichen Medien kultiviert, nach dem Genotyp beurteilt und ausgezählt. Die Gesamtsumme aller Mikroorganismen wurde als die Gesamtsumme der Mikroorganismen jedes einzelnen Probanden angenommen. Die relative Anzahl der Bifido Bakterien wurde bestimmt, in dem die Zahl bei der Auszählung der Bifido Bakterien durch die Gesamtsumme dividiert und mit 100 multipliziert wurde. Die relative Veränderung der Gesamtsumme der Bifido Bakterien wurde dadurch berechnet, daß die Zahl der Bifidos pro Gramm Faeces mit dem Gewicht der Faeces multipliziert wurde. Diese Zahl zu Beginn der Untersuchung wurde gleich 100 gesetzt. Der Vergleichswert nach 14 Tagen wurde zu diesem Normwert jedes einzelnen Probanden in Beziehung gesetzt. Die Werte der Untersuchung sind in Tabelle 2 zusammengefaßt. Die relativen Anteile der Bifido Bakterien werden als Mittelwerte über die Zeit und die Probanden angegeben. Die relativen Anteile Bifido Bakterien in der Gesamtzahl der Mikroorganismen wird als Wert zur Basis 100, dem Wert vor der Behandlung mit LC₁ oder RS-Bifido, auf der Basis des 14-tägigen Endwerts angegeben. Die Ergebnisse zeigen, daß ein Anstieg der täglichen Faecesmenge auftritt und zwar ein höherer Anstieg bei Verwendung von RS-Bifido. Die pH-Werte werden ca. um 0,5 abgesenkt. Weiterhin ist der positive Einfluß auf die Darmepithelzellen an dem starken Anstieg kurzkettiger Fettsäuren erkennbar. Dieser Effekt wird mit den Bifidobakterien allein nicht beobachtet.

Tabelle 2

	vor LC ₁	nach LC ₁	vor RS-Bifido	nach RS-Bifido
Faeces Gewicht (g/Tag)	125+/-29	137+/-35	127+/-32	148+/-35
relative Änderung der Faeces Masse	100	110	100	116
Faeces pH-Wert	6,6+/-0,5	5,9+/-0,5	6,5+/-0,5	6,0+/-0,5
Gesamtzahl der Mikroorganismen pro g Faeces	8,5 x 10 ⁸ +/-0,2 ⁸	9,2 x 10 ⁸ +/-0,2 ⁸	8,6 x 10 ⁸ +/-0,2 ⁸	11,2 x 10 ⁸ +/-0,2 ⁸
relativer Anteil der Bifido Bakterien (%)	9,9+/-0,2	10,3+/-0,2	9,9+/-0,2	13,9+/-0,2
relativer Anteil der Bifidobakterien in der Gesamtzahl der Mikroorganismen	100	195	100	255
Acetat µmol/g Trockengewicht Faeces*	365+/-15	335+/-15	387+/-15	1021+/-15
Propionat µmol/g Trockengewicht Faeces*	87+/-15	91+/-15	89+/-15	675+/-15
Butyrat µmol/g Trockengewicht Faeces*	99+/-15	100+/-15	102+/-15	617+/-15

* nach 6 Stunden Fermentation (= Sättigungswert)

Beispiel 13

Herstellung von hier z.B. Polyglucan Plätzchen mit verringertem Kaloriengehalt.

5 a) Vergleichsbeispiel

20 g Zucker und 50 g weiche Butter werden schaumig geschlagen. Dann werden ein halbes Ei, 50 g Weizenmehl, 30 g gemahlene Haselnüsse, 1 Teelöffel, ein wenig Zitronenschalen, 1 Teelöffel Backpulver und 1 Teelöffel Vanillezucker hinzugegeben.

10 Die Masse wird gut gerührt, bis die Masse sehr trocken und krümelig ist. Es wird ein wenig Milch hinzugegeben und verrührt, so daß sich der Teig leicht aufnehmen läßt. Es wird je ein Teelöffel der Masse auf ein Backblech geben. Im vorgeheizten Backofen (Heißluft) werden die Kekse bei 175°C ca. 15 Minuten gebacken.

15 Herstellung von Backwaren mit Weizenmehl (Vergleichsbeispiel) und Polyglucan Plätzchen

b)

20 Die Durchführung erfolgt wie in Beispiel 13a anstelle des Zuckers (Saccharose) wurde ca. 20 g Polyglucan verwendet (inklusive 1 Teelöffel Vanillezucker). Um eine akzeptable Süße zu erreichen, wurde mit einem handelsüblichen Süßungsmittel (z.B. Natreen) in äquivalenter Dosierung gesüßt.

25 Testpersonen (8) bescheinigten, daß in dem mit dem Geschmack verbundenen Kriterien, wie Mundgefühl, crisp-Effekt, Konsistenz, Klebrigkeit, Beiß- und Kaueffekte und -gefühl und Süße, kein erkennbarer Unterschied empfunden werden konnte, bzw. wenn eine Differenz ausgemacht wurde, daß diese nicht als nachteilig gesehen worden ist. Die Backwaren in Form von Keksen sind wohlschmeckend.

30 Damit ist eine Einsatzmöglichkeit als 'bulking agent', als Zuckerersatzstoff, vor allem in Speisen, aber auch Getränken, etwa Milch-Getränke, Trinkyoghurts, gegeben.

Patentansprüche

1. Zusammensetzung, umfassend ein wasserunlösliches lineares α -1,4-D-Glucan und/oder eine daraus erhaltliche resistente Stärke und wenigstens ein weiteres Lebens- oder Futtermitteladditiv.
2. Zusammensetzung nach Anspruch 1, worin das wenigstens eine weitere Lebens- oder Futtermitteladditiv ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Probiotika, Prebiotika, Vitaminen und Provitaminen, Antioxidantien, Ölen und Fetten und Fettsäuren, sowie Mischungen daraus.
3. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 oder 2, worin das wenigstens eine weitere Lebens- oder Futtermitteladditiv ein Probiotikum, insbesondere ein Bifidobakterium ist.
4. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, worin das wasserunlösliche lineare α -1,4-D-Glucan und/oder die daraus erhaltliche resistente Stärke als Trägermaterial für das wenigstens eine Lebens- und Futtermitteladditiv fungiert.
5. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, worin das wasserunlösliche lineare α -1,4-D-Glucan und/oder die daraus erhaltliche Stärke in Form von Mikropartikeln vorliegt.
6. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, worin das Lebens- oder Futtermitteladditiv von dem wasserunlöslichen linearen α -1,4-D-Glucan und/oder der daraus erhaltlichen resistenten Stärke wenigstens teilweise ummantelt ist.
7. Zusammensetzung nach Anspruch 6, worin das wasserunlösliche lineare α -1,4-D-Glucan ein Molekulargewicht M_w von $0,75 \times 10^2$ bis 10^7 g/mol, bevorzugt von 10^3 bis 10^6 g/mol und besonders bevorzugt von 10^3 bis 10^5 g/mol aufweisen.

8. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 7 worin das wasserunlösliche lineare α -1,4-D-Glucan erhältlich ist durch in-vitro Polymerisation von Glucose unter Einwirkung eines Enzyms mit Amylosucrase-Aktivität.
- 5 9. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 8, welche ein Nahrungsergänzungsmittel ist.
- 10 10. Verwendung einer Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 9 zur Herstellung von Nahrungsmitteln oder Nahrungsmittelvorprodukten.
11. Nahrungsmittel oder Nahrungsmittelvorprodukt, erhältlich unter Verwendung einer Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 9.
- 15 12. Verwendung wasserunlöslicher linearer α -1,4-D-Glucane und/oder daraus erhältlicher resistenter Stärke als Ersatzstoff und/oder Kalorienreduktionsmittel in Lebensmitteln.
- 20 13. Verwendung nach Anspruch 12, worin der Ersatzstoff ein Fettstoffersatz ist.
- 25 14. Resistente Stärke auf Basis wasserunlöslicher linearer α -1,4-D-Glucane als Arzneimittel.
- 30 15. Resistente Stärke nach Anspruch 14, worin das Arzneimittel ein Magen-Darm-Mittel ist.
16. Pharmazeutische oder veterinärmedizinische Zusammensetzung, umfassend einen Gehalt an resistenter Stärke auf Basis wasserunlöslicher linearer α -1,4-D-Glucane.
17. Zusammensetzung nach Anspruch 16, ferner umfassend ein weiteres funktionelles Additiv.

18. Zusammensetzung nach Anspruch 17, worin das funktionelle Additiv ein Lebens- oder Futtermitteladditiv ist, insbesondere ein Probiotikum, beispielsweise ein Bifidobakterium.
- 5 19. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 17 oder 18, worin das funktionelle Additiv ein medizinischer Wirkstoff, insbesondere ein Heilmittel ist.
- 10 20. Verwendung von resistenter Stärke auf Basis wasserunlöslicher linearer α -1,4-D-Glucane zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung und/oder Vorbeugung von Magen-Darm-Erkrankungen.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

national Application No
PCT/EP 99/09298

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 A23L1/09 C08L3/00 A61K9/20 A61K31/715 A23K1/16

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A23L C08L A61K A23K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 506 166 A (UNILEVER N.V.) 30 September 1992 (1992-09-30) page 2, line 5-9,35-37	1,2, 10-14
A	EP 0 688 872 A (CERESTAR HOLDING BV) 27 December 1995 (1995-12-27) cited in the application page 2, line 8-10	1
E	DE 198 30 618 A (AVENTIS RESEARCH & TECHNOLOGIES GMBH & CO KG) 13 January 2000 (2000-01-13) cited in the application the whole document	14
A	WO 97 34932 A (BRITISH TECHNOLOGY GROUP LIMITED) 27 November 1997 (1997-11-27)	16
	-/-	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

29 March 2000

Date of mailing of the international search report

06/04/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3018

Authorized officer

Caturla Vicente, V

Form PCT/ISA210 (second sheet) (July 1992)

page 1 of 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 99/09298

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 846 704 A (CERESTAR HOLDING B.V.) 10 June 1998 (1998-06-10)	1
A	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 1996, no. 04, 30 April 1996 (1996-04-30) & JP 07 313069 A (SAPPORO BREWERIES LTD), 5 December 1995 (1995-12-05) abstract	16, 18

5

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

page 2 of 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International Application No
PCT/EP 99/09298

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
EP 506166	A	30-09-1992	CA	2063784 A	26-09-1992
			JP	5236908 A	17-09-1993
EP 688872	A	27-12-1995	AT	177789 T	15-04-1999
			DE	69508307 D	22-04-1999
			DE	69508307 T	15-07-1999
			ES	2129756 T	16-06-1999
			FI	951794 A	16-10-1995
			GR	3030374 T	30-09-1999
			JP	8056690 A	05-03-1996
			NO	951460 A	16-10-1995
DE 19830618	A	13-01-2000	WO	0002926 A	20-01-2000
WO 9734932	A	25-09-1997	AU	2036997 A	10-10-1997
EP 846704	A	10-06-1998	AU	4684697 A	04-06-1998
			CA	2223149 A	03-06-1998
			JP	10191931 A	28-07-1998
JP 07313069	A	05-12-1995	CA	2148678 A	18-11-1995

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

L. nationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/09298

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 A23L1/09 C08L3/00 A61K9/20 A61K31/715 A23K1/16

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 A23L C08L A61K A23K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der Internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	EP 0 506 166 A (UNILEVER N.V.) 30. September 1992 (1992-09-30) Seite 2, Zeile 5-9,35-37	1,2, 10-14
A	EP 0 688 872 A (CERESTAR HOLDING BV) 27. Dezember 1995 (1995-12-27) in der Anmeldung erwähnt Seite 2, Zeile 8-10	1
E	DE 198 30 618 A (AVENTIS RESEARCH & TECHNOLOGIES GMBH & CO KG) 13. Januar 2000 (2000-01-13) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	14
A	WO 97 34932 A (BRITISH TECHNOLOGY GROUP LIMITED) 27. November 1997 (1997-11-27)	16
	-/-	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der Internationalen Recherche

29. März 2000

Abmeldedatum des Internationalen Recherchenberichts

06/04/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5618 Patentkan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3018

Bevollmächtigter Bediensteter

Caturla Vicente, V

Formblatt PCT/ISA/210 (Blatt 2) (Juli 1992)

Seite 1 von 2

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	EP 0 846 704 A (CERESTAR HOLDING B.V.) 10. Juni 1998 (1998-06-10)	1
A	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 1996, no. 04, 30. April 1996 (1996-04-30) & JP 07 313069 A (SAPPORO BREWERIES LTD), 5. Dezember 1995 (1995-12-05) Zusammenfassung	16,18

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationale Aktenzeichen

PCT/EP 99/09298

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 506166 A	30-09-1992	CA 2063784 A	26-09-1992
		JP 5236908 A	17-09-1993
EP 688872 A	27-12-1995	AT 177789 T	15-04-1999
		DE 69508307 D	22-04-1999
		DE 69508307 T	15-07-1999
		ES 2129756 T	16-06-1999
		FI 951794 A	16-10-1995
		GR 3030374 T	30-09-1999
		JP 8056690 A	05-03-1996
		NO 951460 A	16-10-1995
DE 19830618 A	13-01-2000	WO 0002926 A	20-01-2000
WO 9734932 A	25-09-1997	AU 2036997 A	10-10-1997
EP 846704 A	10-06-1998	AU 4684697 A	04-06-1998
		CA 2223149 A	03-06-1998
		JP 10191931 A	28-07-1998
JP 07313069 A	05-12-1995	CA 2148678 A	18-11-1995

Formblatt PCT/ISA/210 (Anhang Patentfamilie) (Juli 1992)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

α -amylase resistant starch for producing foodstuff and medicaments

The invention concerns compositions containing α -1,4-D-glucans and/or a resistant starch from it, for the production of foodstuff. The invention further concerns the application of resistant starches as medicaments.

Nutritional studies have shown, that incorrect and one-sided nutrition are the ground for numerous illnesses, for example intestinal diseases and in particular colonic cancer. Epidemiological studies have shown, that in the case of a nutrition rich in fat and deficient in roughage there is an increased risk for inflammatory intestinal diseases and colonic cancer occurring in humans. In contrast to this, nutrition, rich in roughage, is considered as contributory to a protective effect against colorectal diseases.

Therefore the production of so called "functional food", i.e. foodstuff, which serve not only the purpose of nutrition but should also promote health, obtained increased significance lately. Such foodstuff are enriched with additives having a health-promoting effect.

One of the additives, receiving increasing significance for the food industry, is resistant starches (RS), i.e. starches that are not broken down by α -amylases. Accordingly, resistant starches are not digested in the small intestine of healthy humans and thus reach the large intestine. Thus resistant starches represent in foodstuff an energy-reduced, body-forming component in the sense of a roughage.

However, with the inclusion of RS-containing foodstuff two further functions are associated, namely the substrate preparation for the energy metabolism of the intestinal microflora and of the epithelial cells of the large intestine. The resistant starch is decomposed oxidatively by the intestinal microorganisms into short-chain fatty acids like acetate, propionate and butyrate. These short-chain fatty acids serve, in turn, the epithelial cells of the large intestine, which particularly rely on the luminal supply of butyrate to maintain their structure and function.

In addition, a high luminal butyrate level in the colon can represent a protective factor against colorectal diseases. While, namely, the butyrate controls in normal

colonocytes[?] the growth via a chain of reactions, that increases the proliferation of normal colon epithelial cells, it seems to suppress the neoplastic development of colonocytes[?].

Resistant starches occur naturally only in small quantities and occur during the recrystallisation (retrogradation) of agglutinated starches. On this occasion microcrystalline filaments are formed, forming a network, due to which an enzymatic hydrolysis will be prevented.

Resistant starches, methods for their production and their application in foodstuff have been long known.

Thus US-A-3 729 380 describes the targeted enzymatic treatment of starches for the purpose of reducing the contents of highly-branched amylopectin and to increase the proportion of short-chain amylasic structures, which usually have a stronger tendency for retrogradation and consequently for the formation of resistant starches than native starches.

EP-A-0 564 893 describes a method for the production of RS products, wherein an aqueous suspension of a starch is agglutinated and is debranched with an enzyme that breaks down the α -1,6-glykocidic bonds. The intermediate product produced is subsequently retrograded.

EP-A-0 688 872 describes a method to produce RS products, wherein an aqueous suspension of a partly broken down, agglutinated starch is enzymatically debranched and the intermediate product is retrograded.

In US-A-5 776 887 a foodstuff composition for diabetics with different carbohydrate fractions is disclosed, which are absorbed at different speeds. The slowly absorbed fraction is in this case a maize starch, that has also a resistant starch content. The aim of US-A-5 776 887 is to evenly release carbohydrates over a longer period so that to prevent an excessive glucose level.

There is, however, still a great requirement for improved foodstuff and preparations, which, by supplying health-promoting materials, promote the well-being of consumers and can prevent an incorrect nutrition and help to cure diseases of, for example, nutritional nature.

Therefore the object of this present invention was to provide foodstuff and fodder (called collectively nutritional agent in the following) on the one hand, as well as pharmaceutical and veterinary agents (called collectively medicaments in the following) on the other, that promote the maintenance of health, strengthen the feeling of well-being and can be used for the treatment and/or prevention of diseases in humans and animals due, for example, to malnutrition.

This objective is achieved by using water-insoluble linear α -1,4-D-glucans in combination with foodstuff and medicament additives to produce the above mentioned products. In this sense this invention is considered as a further development of the older, not prior published DE-A-198 30 618, that describes the use of water-insoluble α -1,4-D-glucans for the production of resistant starches.

Accordingly, the subject matter of this invention are compositions, in particular as nutritional supplement, that contain a water-insoluble linear α -1,4-D-glucan and/or a resistant starch obtainable from it and at least one further food or fodder additive.

Further subject matter are foodstuff obtainable with these compositions.

Further subject matter of this invention is the use of resistant starches based on water-insoluble linear α -1,4-D-glucans as substitute and/or calorie-reducing agent in foodstuff.

Finally, subject matter of this invention is the use of resistant starches based on water-insoluble linear α -1,4-D-glucan as medicaments and pharmaceutical or veterinary compositions containing such resistant starches.

In a surprisingly manner it has been found that during retrogradation water-insoluble linear α -1,4-D-glucans supply large quantities of highly resistant starches, in particular

the RS-III type (Englyst et al. (Classification and measurement of nutritionally important starch fractions, European Journal of Clinical Nutrition, 46 (Suppl.23) (1992) 33-50).

This makes these resistant starches suitable as substitutes for foodstuff, in particular as roughage substitute and as fatty substance substitute, and consequently also as a calorie-reducing agent.

It has further been found, that the resistant starches, obtainable from water-insoluble linear α -1,4-D-glucans, during their breakdown in the large intestine leads not only to a large quantity of short-chain fatty acids, but particularly also to a large proportion of the particularly advantageous butyrate.

It has further been found, that the resistant starch, obtainable from water-insoluble linear α -1,4-D-glucans, when combined with other foodstuff or fodder additives has a synergetic or symbiotic effect by reciprocally intensifying the effects of the components.

In the following under water-insoluble linear α -1,4-D-glucans the non- α -amylase-resistant forms of this glucan are understood.

In this conjunction under water-insoluble α -1,4-D-glucans those α -1,4-D-glucans are understood, which according to the definition of the Deutsches Arzneimittelbuch [Register of German Medicaments] (DAB, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, Gori-Verlag GmbH, Frankfurt, 9th edition, 1987) corresponding to classes 4-7 fall in the categories "slightly soluble", "poorly soluble", "very poorly soluble" and "practically insoluble".

The water insolubility of the α -1,4-D-glucans used according to the invention is useful by that at least 98%, particularly at least 99.5% of the polysaccharide used under normal conditions ($T=25\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 20\%$; $p=101325\text{ Pa}\pm 20\%$) is non-soluble in water (corresponding at least to the classes 4 and 5 of DAB).

Advantageously the water insolubility of the α -1,4-D-glucans used corresponds to classes 6 or 7 of the DAB.

Under linear α -1,4-D-glucans those α -1,4-D-glucans are understood, the degree of branching of which is maximum 4%, i.e. their main chain has maximum four side chains on 100 monosaccharide units,

The degree of branching of the water-insoluble linear α -1,4-D-glucans is appropriately at position 6 no more than 0.5%. At positions 2 or 3 the degree of branching is no more than 1% and in particular no more than 0.5%.

Particularly preferred are water-insoluble linear α -1,4-D-glucans not having branchings at all or the degree of branching of which is so minimal, that it cannot be proven by using conventional methods.

The weight-averaged molecular weight M_w (determined by means of gel permeation chromatography compared with a calibration with pullulan standard) of the water-insoluble linear α -1,4-D-glucans used in accordance with the invention can vary within a wide range. The water-insoluble linear α -1,4-D-glucans used as initial material has appropriately a molecular weight M_w of 0.75×10^2 to 10^7 g/mol, preferably 10^3 to 10^6 g/mol and particularly preferably 10^3 to 10^5 g/mol. A particularly advantageous range is between 2×10^3 g/mol and 8×10^3 g/mol.

Particularly preferred, the water-insoluble linear α -1,4-D-glucans used have a high proportion of polymers with a degree of polymerisation between 10 and 35. Advantageously at least 25%, preferably at least 30% and particularly preferably at least 35% of the α -1,4-D-glucan molecules have a degree of polymerisation of 10 to 35.

The polydispersity M_w/M_n of the water-insoluble linear α -1,4-D-glucans can vary within a wide range. Preferred values for the polydispersity are in the range from 1.01 to 50, particularly from 1.5 to 15. The use of glucans with low polydispersity is, however, preferred due to the better reproducibility of the products obtained.

The α -1,4-D-glucans used can be modified also chemically in a manner known per se, provided the modifications are harmless with regard to the foodstuff and medicaments to be produced. Thus the α -1,4-D-glucans can be chemically modified in a manner

known to the person skilled in the art by etherification or esterification at positions 2, 3 or 6 (see also Functional properties of food components, 2nd edition, Y.Pomeranz, Academic Press (1991); Lehrbuch der Lebensmittelchemie [Textbook of food chemistry] Belitz & Grosch, Springer Verlag (1992); Citrat Starch possible application as resistant starch in different food systems, B.Wepner et al., European Air Concerted Action, Abstract: air3ct94-2203, Functional properties of non-digestible carbohydrates, Pro-Fibre conference, Lisbon, February 1998, page 59). Preferably, however, chemically unmodified α -1,4-D-glucans are used.

The water-insoluble linear α -1,4-D-glucans used in accordance with the invention can be of any origin.

For example, the water-insoluble linear α -1,4-D-glucans from natural plants and animal sources or microorganisms which produce such glucanes, can be obtained by conventional isolations and purification.

Since most natural sources contain the desired water-insoluble linear α -1,4-D-glucans, however, not in the desired quantities, these polysaccharides are advantageously obtained biotechnically. For example, the natural producers of water-insoluble linear glucans can be genetically so manipulated, that when compared with the non-manipulated organism they contain a greater proportion of unbranched or only slightly branched polysaccharides.

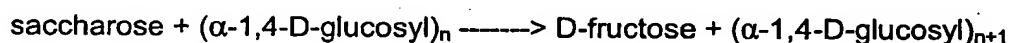
The desired water-insoluble linear α -1,4-D-glucans can be also obtained from highly branched glucans by chemical or enzymatic debranching, for example with debranching enzymes like pullulanases.

The α -1,4-D-glucans used in accordance with the invention are preferably produced by biotransformation or biocatalytically.

In this case under biotransformation or biocatalytic production it is understood, that the water-insoluble α -1,4-D-glucan is produced in-vitro by catalytic polymerisation of

glucose molecules under the influence of a suitable enzyme, in particular an enzyme with amylosucrase activity, under suitable conditions.

An advantageous biocatalytic method to obtain water-insoluble linear α -1,4-D-glucans is described in WO 95/31553, the contents of which disclosure is explicitly the subject matter of this description. According to the method of WO 95/31553 the α -1,4-D-glucan is produced by means of a biocatalytic method from saccharose under the influence of an enzyme with amylosucrase activity, in particular with an amylosucrase from the bacteria of the species *Neisseria polysaccharea*. These enzymes catalyse the formation of α -1,4-glycosidically joined glucans, by transferring the glucosyl radical of the saccharose molecules to the growing polymer chain according to the following reaction model



while releasing D-fructose.

A particularly preferred method to obtain water-insoluble linear α -1,4-D-glucans on the basis of the above reaction model is described in the earlier, not-published German patent application DE-A-198 27 978.1, the contents of which disclosure is explicitly the subject matter of this description. In this case the water-insoluble linear α -1,4-D-glucans are synthesised from saccharose by means of enzymes with amylosucrase activity, preferably from *Neisseria polysaccharea*, in aqueous, buffer-free systems. The reaction may be carried out also in the presence of a water-soluble linear or branched α -1,4-D-glucan, for example a water-soluble dextrin or a water-soluble amylose, since such glucans act as glucosyl group acceptors, on which the enzyme catalyses an α -1,4-[sic] glucan chain extension.

In the case of such a chain extension water-insoluble linear polysaccharides in the sense of this invention result also from the branched polysaccharides, since the degree of branching of the glucosyl group acceptor greatly decreases with the increasing chain extension, i.e. increasing degree of polymerisation. For this purpose the saccharose is added with a large molar excess to the acceptor. In this manner α -1,4-D-glucans with a

molecular weight in the 0.75×10^2 g/mol to 10^7 g/mol range can be produced. At the same time the linear oligomeric or polymeric acceptors can be added either externally, or they can be produced also from the saccharose itself via the amylosucrase.

The formation of resistant starches takes place by retrograding the non-resistant water-insoluble linear α -1,4-D-glucans.

The retrograding of the α -1,4-D-glucans can be carried out by methods known per se, for example by heating or extrusion.

A particularly preferred method for the production of resistant starches is described in the earlier, not-published DE-A-198 30 618, to which explicit reference is made herein and the disclosure of which is subject matter of this description. This method can be simply carried out and it delivers α -1,4-D-glucan preparations with a large proportion of resistant starches.

According to the DE-A-198 30 618 mentioned, the production of resistant starches is carried out in an advantageous embodiment by that first an aqueous suspension or dispersion of the α -1,4-D-glucans is produced. This suspension or dispersion is subsequently heated to a temperature of, for example, 50°C to 100°C , and then the paste obtained is cooled to a temperature preferably in the range of 35°C to freezing point, whereby the α -1,4-D-glucan retrogrades, and then possibly dries.

The terms "suspension", "dispersion" and paste have in this case the meaning familiar to the person skilled in the art (see also Römpp. Chemie-Lexikon, 9th ed., Thieme-Verlag).

In another embodiment corresponding to DE-A-198 30 618 the production of the resistant starches is carried out by that the aqueous suspension or dispersion of the α -1,4-D-glucans is frozen, whereby the α -1,4-D-glucan is retrograded. After thawing out it is possibly dried or dehydrated.

The complete or partial retrograding of the water-insoluble linear α -1,4-D-glucans and the forming of resistant starches can be carried out prior to combining the α -1,4-D-

glucans with the foodstuff and fodder additives, it can take place during the combining of the components of the composition or it can take place in the mixture of water-insoluble linear α -1,4-D-glucans, additives and possible further components.

Under foodstuff and fodder additives in this case both materials and microorganisms are understood, that are added to foodstuff or fodder for the purpose of influencing it or achieving certain properties or effects. In particular additives, having a positive effect on the health and wellbeing of humans and animals are included here.

The foodstuff and fodder additives can be probiotics, prebiotics or other additives.

Under probiotics non-pathogenic microorganisms are understood, that are added live or in the form of spores to the foodstuff or fodder and can have a positive influence on the intestinal flora.

Examples of microorganisms suitable as probiotics are in particular bacteria and fungi. Preferred microorganisms are lactic acid bacteria, in particular the lactobacillus variety, for example Bifido bacteria, microorganisms of the streptococcus variety, for example enterococcus strains, and yeasts, for example the saccharomyces variety, in particular the species *Saccharomyces boulardii*.

Under prebiotics non-digestible materials are understood, that are added to foodstuff and fodder and promote the growth of the certain bacteria in the large intestine.

Examples of prebiotics are in particular roughages, for example nutritional fibres like oligosaccharides and polysaccharides, for example inulin, oligo-fructoses, oligo-fructanes and fructo-oligosaccharides.

Other additives are vitamins and provitamins, in particular vitamin A, vitamins B₁, B₂, B₃, B₅, B₆, B₉ and B₁₂, vitamin C, vitamin D, vitamin E, vitamin F and vitamin K; antioxidants, oils, fats and fatty acids, in particular multiple unsaturated fatty acids, for example Ω -3-fatty acids or essential fatty acids like linoleic and linolenic acid; as well as herbs and extracts.

Preferably combinations of α -1,4-D-glucans and/or resistant starches and foodstuff and fodder additives are used, that do not change the technical prerequisites for processing the foodstuff on the one hand and do not basically influence the property pattern of the foodstuff on the other. This is the case, for example, when the caloric balance of the foodstuff is not modified by the functional additives. This is achieved either by that two or more functional additives are neutral as far as relative specific properties are concerned or the positive or negative effect of a functional component is cancelled by the negative or positive effect of the other functional component.

Particularly advantageous are compositions, that in addition to the water-insoluble linear α -1,4-D-glucan and/or the resistant starch, that is a prebiotics itself, contain probiotics. The probiotics is preferably a Bifido bacterium. This combinations leads to an unexpected symbiotic effect, whereby the resistant starch is digested by the intestinal microorganisms while forming short-chain fatty acids, that in turn serve as nutrition for the Bifido bacteria and promote its proliferation.

The production of the compositions according to the invention can be carried out by simple mixing.

In a particularly advantageous embodiment the water-insoluble linear α -1,4-D-glucan or the resistant starch obtainable from it serve as a carrier for at least one foodstuff or fodder additive.

In a further preferred embodiment the water-insoluble linear α -1,4-D-glucan or the resistant starch obtainable from it is present in the form of microparticles, In particular spherical microparticles, which consist totally or partially from the glucan. This is a particular advantage when the water-insoluble linear α -1,4-D-glucan or the resistant starch obtainable from it is to serve as a carrier for foodstuff and fodder additives.

On this occasion under spherical microparticles roughly ball-shaped microparticles are understood, the deviation of which in the axial lengths from an ideal ball, that is described by axes of the same length originating from a common source and directed into space, which define the radius of the ball in all spatial directions, is not more than

40%. Preferably spherical microparticles with deviations of not more than 25%, particularly preferred with not more than 15% are used.

The specific surface of the microparticles is usefully in a range of $1\text{ m}^2/\text{g}$ - $100\text{ m}^2/\text{g}$, preferably between $1.5\text{ m}^2/\text{g}$ - $20\text{ m}^2/\text{g}$ and particularly preferably between $3\text{ m}^2/\text{g}$ - $10\text{ m}^2/\text{g}$.

The average diameter (numerical average) of the microparticles is usefully in a range of 1 nm - $100\text{ }\mu\text{m}$, preferably 100 nm - $10\text{ }\mu\text{m}$ and particularly preferably between $1\text{ }\mu\text{m}$ - $5\text{ }\mu\text{m}$.

The dispersity $D = d_w/d_n$ of the microparticles, wherein d_w is the weighted average of the diameter and d_n the numerical average of the diameter of the microparticles, is usefully in a range of 1 to 10, preferably 1.5 to 5 and preferably 2 to 3. The average values d_w and d_n are defined as

$$d_n = \sum n_i \times d_i / \sum n_i; \text{ and}$$

$$d_w = \sum n_i \times d_i^2 / \sum n_i \times d_i$$

wherein

- d_i the diameter of the particles of the species i ;
- n_i the number of particles i with the diameter d_i ; and
- i an ongoing parameter.

In this conjunction the term "weight" does not stand for mass but for a weighted average, whereby the larger diameters receive a higher place value. Diameters of larger particles are weighted stronger by using the exponents 2.

The forming of microparticles, which are made up totally or partially from resistant starch, can be carried out, for example, by simple grinding of the resistant starch, that was obtained from the above described paste.

Further methods for the production of microparticles are described in the earlier German patent applications DE-A-197 37 481.6, DE-A-198 39 214.1, DE-A-198 39 216.9 and DE-A-198 39 212.5, to which particular reference is made and the disclosures of which are also part of this description.

The production of the preferably spherical microparticles is carried out usefully by dissolving the water-insoluble α -1,4-D-glucans or the resistant starches obtainable from them in a solvent that is harmless as far as food technology is concerned, for example by dissolving in aqueous alkali, introducing the solution into a precipitating agent, preferably water, cooling the mixture obtained in this manner to preferably 10 °C to -10 °C and separating the microparticles formed.

The structure and surface of the microparticles can be controlled by the type of the precipitating agent used. By using suitable additives, in particular those permitted in food technology, for example sugars like fructose, saccharose and glucose the structure, size and the surface of the particles can also be influenced.

The concentration of the α -1,4-D-glucan or of the resistant starch in the solution can vary in a wide range and is preferably approx. 0.1 to 1 g/mL of solvent.

Microparticles with an average size of 0.1 μ m to 3 μ m can be advantageously obtained with this method if α -D-glucan, soluble in hot water, is added to the precipitating agent.

The porosity of the microparticles can be controlled also by the selection of the method used for the production of the water-insoluble linear α -1,4-D-glucan. Thus, for example, the adding of inactive ingredients during the biotechnological production of the polysaccharide can influence the porosity of microparticles obtained from such polysaccharides. In particular, it has been found, that the porosity of the microparticles, which are formed entirely or partially from the water-insoluble linear α -1,4-D-glucans, can be increased when the production of the glucan from saccharose is carried out by means of amylosucrase in the presence of a glucosyl group acceptor, e.g. dextrin. In this conjunction the higher the concentration of the glucosyl group accept during the biotrasformation the more porous the microparticles will be.

The application of foodstuff and fodder additives on the carrier material can be carried out, for example, in the case of liquid foodstuff and fodder additives, like unsaturated fatty acids, by simple mixing. However, the additives can be added to a precipitating bath, from which the microparticles will be obtained. During the formation of the microparticles the additives are adsorbed on the surface of the particle.

In a further advantageous embodiment the foodstuff and fodder additives are at least partially enveloped or encapsulated with water-insoluble linear α -1,4-D-glucans or resistant starches. In this manner not only the synergetic or symbiotic effect is reinforced, but an additional stabilising effect is also achieved. Particularly advantageous is this embodiment in case of a combination of water-insoluble linear α -1,4-D-glucans and/or resistant starches with probiotics, while the living organisms are encapsulated by means of a layer of a resistant starch and possibly other polysaccharides and by virtue of this are protected also from detrimental influences, like those occurring, for example, during the processing of foodstuff.

The enveloping can be carried out in a manner known per se by aqueous dispersion or suspension processes.

The compositions can exclusively contain water-insoluble linear α -1,4-D-glucans and/or resistant starches obtainable from them and the respective additives or further additives, for example further nutritional supplements.

The compositions according to the invention can contain the water-insoluble linear α -1,4-D-glucans in a form that is not resistant to α -amylase, in the form of resistant starches obtainable from them or in the form of their mixtures.

In a possible embodiment the composition according to the invention contains glucans predominantly as water-insoluble linear α -1,4-D-glucans, therefore in a form that is not resistant to α -amylase. Such compositions are suitable, for example, for the production of foodstuff and preliminary products for foodstuff, in which the resistant starches are formed only by a further treatment or processing prior to consumption, for example by heating.

In a further embodiment the composition according to the invention contains the glucans predominantly in the form of resistant starches. Such compositions can be added to the foodstuff, for example, also after process steps, like warming up or heating. The contents of the resistant starches in such compositions, based on the total quantity of α -1,4-D-glucan, is chosen as high as possible. The content, as determined by Englyst (see above) is usefully at least 25% by weight, preferably at least 65% by weight, in particular 75% and particularly preferably at least 90% by weight, in particular 95 to 99% and more.

The compositions according to the invention can be used in a plurality of foodstuff. Examples for suitable foodstuff are milk and milk products, like yoghurt, curd cheese or slices or pudding; bread, dips, drinks, muesli bars, cereals, biscuits, cakes, pastries, sauces, noodles, potato puree and other potato dishes like chips, souffles, thickeners, designer drinks, drink powders and prepared dishes.

Resistant starches on the basis of water-insoluble linear α -1,4-D-glucan and its compositions can be used as substitutes for foodstuff components, in particular as substitute for fatty substances, and thus as calorie-reducing agents. In this manner they can affect a cell stimulation and influence the appetite.

The breakdown of the resistant starches in the intestine to short-chain fatty acids, in particular to the particularly advantageous butyrate, its suitability as substitute material and the synergetic and symbiotic effects in combination with other foodstuff or fodder additives are, however, not the only advantage when using resistant starches in foodstuff. Resistant starches can, namely, in particular together with other foodstuff and fodder additives used also for the improvement of the properties of the foodstuff. Thus, depending on the chosen additive, the composition according to the invention can lead to an increase of gel formation, improvement of the flow properties, increase or reduction of the viscosity, improvement of the sorption behaviour, increase or reduction of swelling properties and an improvement of paste-producing temperature of the products containing polysaccharides. Equally, the composition according to the invention can be used to influence the solubility, transparency and the texture of the structure of the pasty structure and to improve the stabilities of the products with regard to heat, cold, acid and shear. Furthermore, the use of the compositions according to the

invention can increase the film-forming tendency, positively influence the freezing and thawing stabilities and improve digestibility. In addition, covering effects could come to fruition, justified by taste, the so called mouth feel or smell.

The fact, that the resistant starches obtainable from the water-insoluble linear α -1,4-D-glucans deliver during digestion an excessively high content of butyrates that is favourable for the intestinal flora, makes these starches suitable also to be used in medicinal and veterinary medicinal preparations, in particular in combination with other functional additives, for example the aforementioned foodstuff and fodder additives, but also together with other remedies. The use of resistant starches based on water-insoluble linear α -1,4-D-glucans as medications, alone or in combination with other functional additives, has a positive affect on numerous syndromes. Thus medicaments based on resistant starches according to the invention are suitable, for example, to treat cardiac diseases, gastro-intestinal diseases, arthritis, immunological illnesses, mental dysfunctions, nerve diseases, psychological disorders, sleeping disorders, disorders of the musculature, diseases influencing the hormone balance, diseases of the thyroid, diseases of the internal organs, changes in the blood count, circulatory illnesses, allergies, skin diseases and illnesses that can be attributed to malnutrition. Preparations with resistant starches can also be used as appetite depressant.

Accordingly, resistant starches based on water-insoluble α -1,4-D-glucans, alone or in combination with other functional additives, can be also used as medicaments, as a matter of fact as therapeutic agents, also as prophylactic or diagnostic agents. In this connection the medical preparations, containing resistant starches, can also contain conventional inactive ingredients and carrier materials and be present in the usual forms of administration, for example in the form of tablets, depot formulations or means with controlled release of the active substance.

The present invention is explained in detail by the following examples.

Examples

Example 1

Production of α -1,4-D-glucans

5 L of a sterilised 30% saccharose solution is added into a 5 L vessel. A portion of enzyme extract, that contains an amylosucrase from *Neisseria polysaccharea* (WO-A-95/31553), was added and it was mixed. The enzyme activity introduced was in this experiment 148000 units. The closed vessel was incubated at 37 °C. During the biotransformation a white sediment was formed. The reaction was terminated after 39 h. The sediment was centrifuged, frozen at -70 °C and subsequently freeze-dried. The mass of the freeze-dried solids was 526.7 g (70.2% yield).

To separate low-molecular sugar, 200 g of the solids was washed with water for 30 min while agitating at room temperature, frozen at -70 °C and freeze-dried. After dissolving the solids in DMSO the contents of fructose and saccharose was determined by a coupled enzymatic assay and it was 4.61 mg fructose per 100 mg of solids (4.6%). The saccharose contents was below the limit of detection.

The supernatant of the biotransformation was denaturised at 95 °C. After cooling it to room temperature it was again centrifuged. The clear supernatant was frozen at -70 °C and thawed out at 4 °C over 3 days. The sediment produced thus was frozen at -70 °C and freeze-dried.

To separate low-molecular sugar 39.5 g of solids was washed with water for 30 min while agitating at room temperature, frozen at -70 °C and freeze-dried. The fructose and saccharose contents was determined after dissolving the solids in DMSO by a coupled enzymatic assay according to Stitt et al. (Meth. Enzym. 174 (1989) 518-552) and it was 2.27 mg fructose per 100 mg of solids. The saccharose contents was below the limit of detection.

Example 2**Determination of the molecular weight of the material obtained according to Example 1**

2 mg of the α -1,4-D-glucan from Example 1 was dissolved at room temperature in dimethylsulphoxide (DMSO, von Riedel-de-Haen) and filtered. A portion of the solution was injected into a column for gel permeation chromatography. As elution agent DMSO was used. The signal intensity was measured by an RI detector and evaluated according to pullulan standards (Polymer Standard Systems company). The flow rate was 1.0 mL per minute.

The measurement results in a numerical average of the molecular weight (M_n) of 2.326 g/mol and a weighted average of the molecular weight (M_w) of 3.367 g/mol. The recovery rate is 100%.

Example 3**Determination of the RS content**

200 mg (dry weight) of the powdery product to be analysed for its RS content was incubated with the enzyme mixture described at pH 5.2 for 120 min according to the method of Englyst et al. (Eur. J. Clin. Nutrition, 46 (1992) (Suppl.2) pages 33-550) to determine the RS content. After terminating the enzymatic breakdown the activity of the enzyme was stopped by lowering the pH value to 3 and the temperature to 20 °C. Following this an 80% (v/v) ethanolic solution was prepared by adding a quadruple quantity of ethanol. The 80% ethanolic solution was let to stand for 1 h at room temperature. The precipitate was centrifuged (2500 x g, 10 min) and the supernatant was discarded. The residue was washed three times with 80% (v/v) ethanol and once with absolute ethanol and centrifuged. The residue was lyophilised and weighed. The dry mass of the residue was determined and the RS content calculated according to the following equation:

$$\text{RS (\%)} = 100 \times \text{weight of the residue (dry weight)} / \text{initial weight (dry weight)}$$

Examples 4 to 7

A linear, nature-identical α -1,4-D-glucan according to Example 1 was heated in aqueous solution and a paste has formed. This paste was adjusted to 10% by weight solids and apportioned. The portions were retrograded at 4 and 25 °C (Examples 5 and 6) or with the aid of a step-by-step program (Example 7). Furthermore, the linear carbohydrate polymer was frozen out from the reaction deposit (Example 4). The retrograded specimens were dried and the RS content was determined as described above.

Table 1 illustrates the influence of the temperature and conditions of the retrogradation on the RS content in the product, produced from a 10% paste of the α -1,4-D-glucan used by a 24 h retrograding.

Table 1

Example	Temperature of retrogradation	RS (% by weight)
4	- 70 °C	78±4
5	4 °C	70±2
6	25 °C	87±1
7	Step-by-step program	74±3

The example in Table 1 shows that the temperature of retrogradation influences the RS contents. Thus a retrogradation at 25 °C leads to a markedly higher RS proportion than a retrogradation at 4 °C. In contrast to this, by retrograding at -70 °C a slightly higher RS proportion is obtained than at retrogradation at 4 °C.

Example 8

Determination of the solubility of [something missing] of α -1,4-D-glucans and classification according to the Deutsches Arzneimittelbuch (DAB)

564 mg α -1,4-D-glucan from Example 1 was heated in approx. 0.5 L bidistilled water at 1.3 bar and 130 °C for 1.5 h in an autoclave (Certoclav). First the reaction vessel was weighed. Afterwards the apparatus is relieved and cooled at room temperature. The contents is weighed. It is 501.74 g. After a further 24 h it is centrifuged and decanted. The solid residue is dried and weighed. It is 468 mg. From this a dissolved portion of 96 mg is calculated. Based on the solvent used it is calculated that for 1 mg α -1,4-D-glucan

5226 mg water is required. According to the classification by the Deutsches Arzneimittelbuch from this follows a classification that this substance is "very poorly soluble", since between 1000 and 10000 parts of solvent is required to dissolve 1 part of the substance. This corresponds to solubility class 6 of the DAB.

Example 9

Determination of the solubility of α -1,4-D-glucans and classification according to the Deutsches Arzneimittelbuch (DAB)

The trial was carried out in accordance with Example 8 with an α -1,4-D-glucan obtained similarly to Example 1. The only difference was a cooling process, that was carried out after the autoclave treatment and the cooling to room temperature. The mixture of the substance is stored for 3 h at 5 °C.

526 mg α -1,4-D-glucan was weighed into approx. 480 mL bidistilled water. After the thermal treatment the weight was 468.09 g. The dried sediment was 488 mg. Accordingly, 38 mg of the α -1,4-D-glucan was dissolved. This corresponded to a ratio of 1 mg substance to 12305 parts of solvent. Accordingly, the substance according to this treatment method was classified in class 7 of the DAB and consequently classified as "practically insoluble", because more than 10000 parts of solvent were required for one part of substance.

Example 10

Production of muesli bars with resistant starch

Muesli bars with various quantities of resistant starches (RS) have been produced.

Basic recipe:	40% honey
	30% rolled oats
	6% sunflower seed
	9% hazel nut
	6% porridge oats
	9% chocolate pieces

- a)
- 40% honey
 - 30% rolled oats
 - 6% sunflower seed
 - 9% hazel nut
 - 6% porridge oats
 - 9% chocolate pieces
 - 3% amylose (RS)
- b)
- 40% honey
 - 24% rolled oats
 - 6% sunflower seed
 - 9% hazel nut
 - 6% porridge oats
 - 6% chocolate pieces
 - 9% amylose (RS)
- c)
- 36% honey
 - 24% rolled oats
 - 6% sunflower seed
 - 9% hazel nut
 - 6% porridge oats
 - 6% chocolate pieces
 - 9% amylose (RS)
 - 4% highly unsaturated fatty acids
- d)
- 40% honey
 - 21% rolled oats
 - 6% sunflower seed
 - 9% hazel nut
 - 6% porridge oats
 - 6% chocolate pieces
 - 12% amylose (RS)

The ingredients were well mixed and baked for approx. 4 h at 70 °C in a drying cabinet or oven. The consistency of the muesli bars was not different from the bars according to the basic recipe and they were tasty also when containing resistant starch.

Example 11

Study of the formation of short-chain fatty acids (SCFA) by in-vitro fermentation of the α -amylase resistant portions by freshly taken faeces specimens

1 mL of a 5% faeces suspension (15 g freshly taken human faeces in 50 mL Soerensen buffer, pH 6.5; buffer from potassium hydrogen phosphate and disodium hydrogen phosphate-dihydrate) were mixed and homogenised in a cryo-tube charged with nitrogen gas with 10 mg each resistant structures according to Example 1, isolated by enzymatic hydrolysis and, as a comparison, retrograded maize starch, National Starch & Chemical, USA, from Noveloše. The fermentation was carried out at 37 °C. Specimens were taken and frozen hourly.

The concentration of short-chain fatty acids was determined in a faeces suspension with the aid of gas chromatography on a capillary column (Carbowax 20M) by using a temperature program. As GC system an HP 5890 Series II-station with HP 7673 GC/SCF injector, HP GC-autosampler controller, detector FID; software - HP Chemstation, were used. As mobile phase helium was used.

200 mg of the faeces suspension was suspended with the quadruple quantity of water and homogenised. A portion of this diluted working faeces suspension was used to determine the dry mass.

500 mg of the working faeces suspension were centrifuged. 100 μ L of the residue was mixed with 25 μ L 1M sodium hydroxide solution. The enclosed vessel with bored-through lid was placed into liquid nitrogen and freeze-dried. The dried specimen was mixed with 100 μ L 5M formic acid and 400 μ L acetone and agitated on a vortex. The organic phase formed was decanted into phials of an autosampler which were immediately closed. From each of them 1 μ L was injected into a GC. As external standards acetic acid, propionic acid, butyric acid, isobutyric acid, valeric acid and isovaleric acid (Sulpeco) were used.

The fermentation of the resistant structures was carried out parallel in double-fermentation studies.

The fermentability of the structures used was proven to be different. In particular the formation rates and the spectres of the short-chain fatty acids were different.

By in-vitro fermentation of the resistant structures according to Example 1 markedly higher levels of short-chain fatty acids and of butyrate were achieved during comparable fermentation periods. Whereas by an 8 h fermentation of the resistant structures according to Example 1 an SCFA level of approx. 2000 $\mu\text{mol/g}$ dry weight was obtained, while the butyrate contents was approx. 60%, the SCFA level after the same fermentation period of resistant structures from Novelose was only approx. 750 $\mu\text{mol/sic}$ dry weight. At the same time the butyrate had an approx. 35% proportion.

Consequently, by fermenting resistant structures of the water-soluble α -1,4-D-glucan, used as initial product according to the invention, faster and more butyrate is produced than from resistant starches from Novelose.

Example 12

The influence of a combination of resistant starches and Bifido bacteria on the activity and growth of Bifido bacteria as well as of intestinal cells

To test the influence of the combination of resistant starches and Bifido bacteria on the intestinal flora, 10 g resistant starch, produced as described in Examples 4 to 7, was administered orally to 5 healthy test subjects over a period of 14 days. During breakfast the specimens were consumed in the form of a yoghurt containing Bifido bacteria, into which the polyglucan was mixed (Yoghurt LC₁ of the Nestlé company). The average age of the test subjects was 38.9 years and their average weight 67.3 kg. The values of the study were compared with a control. The control consisted of the same test subjects. They were subjected to a study 3 month before the second study. Yoghurt with Bifido bacteria without RS was consumed. The test subjects did not take any yoghurt or similar foodstuff, containing Bifido bacteria already 10 weeks prior to the commencement of the control study and during the approximately 10 weeks after finalising the first control study up to the second study (RS-Bifido). The absolute quantity of Bifido bacteria was determined in accordance with a method first time

published in the following literature (A color atlas of anaerobic bacteria", 1984, pages 53-65, T. Mitsuoka (publisher), Kabushiki Kaisha Sobunsha publishing company, Yokyo, Japan (1984)). The grown colonies were cultivated in various media, afterwards the gene type assessed and counted. The total sum of all microorganisms was assumed as the total sum of the microorganisms of each individual test subject. The relative number of the Bifido bacteria was determined by dividing the number of the Bifido bacteria by the total sum and multiplying it by 100. The relative change of the total sum of Bifido bacteria was so calculated, that the number of Bifidos per gram of faeces was multiplied by the weight of the faeces. At the commencement of the study this number was taken as 100. After 14 days the comparative value was compared with this standard value of each test subject. The values of the study are compiled in Table 2. The relative proportions of the Bifido bacteria are stated as average values over the period and for the test subjects. The relative proportions of Bifido bacteria in the total number of the microorganisms is stated as value on a 100 base, the value prior the treatment with LC₁ or RS-Bifido on the basis of the 14-day final value. The results show that an increase of the daily quantity of faeces occurs, in fact a greater increase when using RS-Bifido. The pH values were reduced by approx. 0.5. Furthermore, the positive influence on the intestinal epithelial cells can be recognised on the strong increase of short-chain fatty acids. This effect is not observed with Bifido bacteria alone.

Table 2

	before LC ₁	after LC ₁	before RS-Bifido	after RS-Bifido
Weight of faeces (g/day)	125±29	137±35	127±32	148±35
Relative change of the faeces mass	100	110	100	116
pH value of the faeces	6.6±0.5	5.9±0.5	6.5±0.5	6.0±0.5
Total number of microorganisms per 1g of faeces	8.5x10 ⁸ ±0.2 ^a	9.2x10 ⁸ ±0.2 ^a	8.6x10 ⁸ ±0.2 ^a	11.2x10 ⁸ ±0.2 ^a
Relative proportion of Bifido bacteria %	9.9±0.2	10.3±0.2	9.9±0.2	13.9±0.2
Relative proportion of Bifido bacteria in the total number of microorganisms	100	195	100	255
Acetate µmol/g dry weight of faeces*	365±15	335±15	387±15	1021±15
Propionate µmol/g dry weight of faeces*	87±15	91±15	89±15	675±15
Butyrate µmol/g dry weight of faeces*	99±15	100±15	102±15	617±15

* After 6 hours of fermentation (= saturation value)

Example 13

Production of, for example, polyglucan biscuits with reduced calorie content

a) Comparison example

20 g sugar and 50 g soft butter are beaten until foam is produced. Then half an egg, 50 g wheat flour, 30 g ground hazel nut, 1 teaspoon [of ? something missing], a little lemon

ring, 1 teaspoon of baking powder and 1 teaspoon vanilla sugar are added. The mass is well stirred until it becomes very dry and crumbly. A little milk is added and stirred, so that the dough will be absorbent. The mass is apportioned by a teaspoon on a baking tray. The biscuits are baked in a pre-heated baking oven (hot air) at 175 °C for approx. 15 min.

Production of baked products with wheat flour (comparison example) and polyglucan biscuits

b)

The procedure is carried out like in Example 13a, instead of sugar (saccharose) approx. 20 g polyglucan was used (incl. 1 teaspoon vanilla sugar). To achieve an acceptable sweetness, it was sweetened with a commercially available sweetener (e.g. Natreen) in an equivalent quantity.

The testing persons (8) confirmed, that as far as criteria associated with taste, like feel in the mouth, crispiness, consistency, tackiness, biting and chewing effects and feels and sweetness, no difference could be detected, or, if there was a difference it was not considered as disadvantageous. The baked products in the form of biscuits taste good. Thus a possible application as "bulking agent", as sugar substitute, especially in meals, but also in drinks, possibly milk drinks, drinking yoghurts, is established.

Patent claims

1. A composition comprising a water-insoluble linear α -1,4-D-glucan and/or a resistant starch obtainable from it and at least one further foodstuff or fodder additive.
2. A composition according to claim 1, wherein the at least one further foodstuff or fodder additive is selected from the group comprising probiotics, prebiotics, vitamins and provitamins, antioxidants, oils and fats and fatty acids, as well as mixtures of these.
3. A composition according to one of the claims 1 or 2, wherein the at least one further foodstuff or fodder additive is a probiotics, in particular a Bifido bacteria.
4. A composition according to any one of claims 1 to 3, wherein the water-insoluble linear α -1,4-D-glucan and/or the resistant starch obtainable from it functions as a carrier material for the at least one foodstuff or fodder additive.
5. A composition according to any one of claims 1 to 4, wherein the water-insoluble linear α -1,4-D-glucan and/or the resistant starch obtainable from it is present in the form of microparticles.
6. A composition according to any one of claims 1 to 5, wherein the foodstuff or fodder additive is enveloped at least partially by the water-insoluble linear α -1,4-D-glucan and/or the resistant starch obtainable from it.
7. A composition according to claim 6, wherein the water-insoluble linear α -1,4-D-glucan has a molecular weight M_w of 0.75×10^2 to 10^7 g/mol, preferably 10^3 to 10^6 g/mol and particularly preferably 10^3 to 10^5 g/mol.
8. A composition according to any one of claims 1 to 7, wherein the water-insoluble linear α -1,4-D-glucan is obtainable by in-vitro polymerisation of glucose affected by an enzyme with amylosucrase activity.

9. A composition according to any one of claims 1 to 8 that is a nutritional supplement.
10. The use of a composition according to any one of claims 1 to 9 to produce foodstuff or pre-products for foodstuff.
11. Foodstuff or pre-products for foodstuff, obtainable by using a composition according to any one of claims 1 to 9.
12. The use of water-insoluble linear α -1,4-D-glucans and/or resistant starches obtainable from them as substitute and/or calorie-reducing agent in foodstuff.
13. The use according to claim 12, wherein the substitute is a substitute for a fatty substance.
14. Resistant starches based on water-insoluble linear α -1,4-D-glucans as medicament.
15. Resistant starches according to claim 14, wherein the medicament is a gastro-intestinal agent.
16. A pharmaceutical or veterinary medicinal composition, comprising a quantity of resistant starch based on water-insoluble linear α -1,4-D-glucans.
17. A composition according to claim 16, further comprising a further functional additive.
18. A composition according to claim 17, wherein the functional additive is a foodstuff or fodder additive, in particular a probiotics, a Bifido bacterium, for example.
19. A composition according to one of the claims 17 or 18, wherein the functional additive is a medical active substance, in particular a medication.
20. The use of resistant starches based on water-insoluble linear α -1,4-D-glucans to produce a medicament to treat and/or prevent gastro-intestinal diseases.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.